









Aus dem Hygiene-Institut der Universität Mainz  
(Direktor: Prof. Dr. H. Kliewe)

---

VERSUCHE ZUR BEEINFLUSSUNG DER  
PHOSPHATASEAKTIVITÄT VON STAPHYLOKOKKEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Johannes Gutenberg-Universität zu Mainz

vorgelegt von

URSULA TRIEBEL

aus Bünde/Westf.



Mainz 1961

Dekan: Prof. Dr. Dr. K. Lang  
Referent: Prof. Dr. Dr. G. Gillissen  
Korreferent: Prof. Dr. H. Kliewe  
Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juni 1961



GESAMTHERSTELLUNG:

DITTERS BÜRODIENST, MAINZ, Augustinerstraße 64 - 66

## INHALTSVERZEICHNIS

- 1) Einleitung und Ziel der Arbeit
- 2) Kurzer literarischer Überblick über das Resistenzproblem

### Eigene Untersuchungen

- 3) Material und Methoden
- 4) Besprechung der Ergebnisse
- 5) Diskussion
- 6) Zusammenfassung
- 7) Literaturverzeichnis



## 1) EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

Es ist Aufgabe dieser Arbeit festzustellen, ob und inwieweit verschiedene Phosphate die Aktivität der sauren Phosphatase von Staphylokokken hemmen. Dabei soll *M. pyogenes* var. *aureus* Sg 511 als Testkeim verwendet werden. Die Untersuchungen gingen von der Mitteilung von Barnes und Morris aus, die sagen, daß Phosphationen die Phosphatase hemmen (Barnes E.H. Morris J.F., J. Bact. 73/1, 100 (1957)). Die Phosphatasebestimmung bei Staphylokokken ist insofern von Interesse als - korrelationstatistisch gesichert - bei *Staphylococcus aureus* die Phosphataseaktivität der Keime mit ansteigender Penicillinresistenz zunimmt. (Gillissen und Ruda, 1958).

## 2) KURZER LITERARISCHER ÜBERBLICK ÜBER DAS RESISTENZPROBLEM

Seit der Einführung der Chemotherapie beobachtete man an Mikroorganismen Resistenzerscheinungen. Daraus erklärt sich auch der hauptsächlich in Krankenhäusern beobachtete Hospitalismus. Die Entstehung resistenter Populationen von Mikroorganismen wurde im wesentlichen auf Änderungen des genetischen Materials zurückgeführt bzw. auf selektionierende Milieufaktoren.

Man unterscheidet die Resistenz der Keimpopulationen von der individuellen Resistenz der Zelle. Dieser Unterschied ist dadurch gegeben, daß man beim Resistenzgrad der Gesamtpopulationen eines Bakterienstammes den mittleren Resistenzgrad der Population mißt. Der individuelle Resistenzgrad liegt im Sinne einer Normalverteilungskurve vor. Die individuelle Resistenz der Zelle ist als genetische Information der Zelle fixiert.

Bringt man eine einzelne Zelle zur Vermehrung, dann bilden sich zwangsläufig in Abhängigkeit von den Milieuverhältnissen resistente Mutanten aus, deren Häufigkeit durch Bestimmung der Mutationsrate erfaßt wird. Man versteht darunter die Zahl der Mutationen pro Zelle pro Teilungszyklus.

Der Grad der erreichbaren Resistenz eines Bakterienstammes scheint von der Keimart und dem Wirkstoff abhängig zu sein. Eine entscheidende Eigenschaft der Bakterien ist die Mehrfachresistenz, das bedeutet eine Resistenz gegen

nicht an den Keimen ausgetesteten Stoffen. Zwei Möglichkeiten sind bekannt (Szybalski u. Bryson, 1952):

1. eine reziproke Kreuzresistenz (meistens bei chemisch verwandten Stoffen) und
2. eine nicht reziproke Resistenz.

So besteht z. B. bei den mit einem bestimmten Sulfonamid behandelten Keimen im allgemeinen eine Kreuzresistenz zu anderen Sulfonamiden, während die Pc-Resistenz ziemlich spezifisch ist. Gleichzeitig beobachtet man eine Kolateralsensibilität, d. h. man findet bei manchen Bakterienstämmen bei Resistenzerhöhung gleichzeitig eine Sensibilitätszunahme gegen andere Stoffe (Szybalski, 1953).

Bei Bakterien sah man im Gegensatz zu den Protozoen häufig im Gefolge einer Chemoresistenz Änderungen in der Morphologie der Keime, die teils nur während der Einwirkung des Chemotherapeutikums vorhanden waren (Hirsch, 1945, Jensen, Möller u. Thofern, 1954), teils auch in Abwesenheit der Droge.

In einigen Fällen wurde festgestellt, daß mit zunehmender Chemoresistenz auch Virulenzänderungen eintraten. Meissner beobachtete, daß bei TBC mit zunehmender INH-Resistenz die Virulenz abnahm. Ähnliche Beobachtungen machten Gillissen und Schilling. Danach nahm mit zunehmender Pc-Resistenz die  $\alpha$ -Haemolysinbildung ab, während die Plasmakoagulaseaktivität sich nicht veränderte. Nimmt man die Plasmakoagulaseaktivität als Kriterium der Pathogenität und die  $\alpha$ -Haemolysinbildung als Kriterium der Virulenz, dann nimmt mit zunehmender Pc-Resistenz unter Beibehaltung der Pathogenität die Virulenz ab.

Es konnte ferner gezeigt werden (Gillissen u. Ruda), daß ebenfalls bei *Staphylococcus aureus* die Phosphataseaktivität in statistisch gesicherter Weise mit ansteigender Pc-Resistenz zunimmt.

Weiterhin wurden der Haemolysintiter, der Erwerb einer Dehydrogenaseaktivität, die Änderung der Kohlenhydratfermentation u. a. auf die Beziehung zwischen Chemoresistenz und Stoffwechseländerungen untersucht.

Die Ursache der Antibiotika-Resistenz kann durch Fermente bedingt sein, wie z. B. Versuche mit der Penase (Kirby, 1944, Spink, Hall u. Ferris, 1945, Barber, 1947, Barber, 1953, Barber u. Whitehead, 1949) und Chloramphenicol-Reduktase (Merkel u. Ster, 1952, 1953) zeigten, ebenso aber auch durch das Ausmaß der Wirkstoffaufnahme und -bindung durch Zellfaktoren (Übers.s. Gillissen u. Gillissen, 1960).

Außerdem zeigte sich in vielen Versuchen, daß ein Verhältnis zwischen Wirkstoffbindung und Resistenz eines Keimes besteht, d.h. auf Pc und Staphylokokken bezogen, daß bei erhöhter Resistenz ein vermindertes Bindungsvermögen der Staphylokokken für Pc besteht (Rowley, Cooper, Roberts u. Lester-Smith, 1950). Hierbei soll auch die Permeabilität der resistenten Zellen eine Rolle spielen (Umbreit u. Tonhazy, 1949). Ebenso ist zu beachten, daß mehrere Aminosäuren und einige Vitamine durch ihren Antagonismus zum Wirkstoff die Resistenz erhöhen können. Die Erscheinungen der Chemoresistenz treten deutlich auf bei direktem Kontakt mit dem chemischen Agens in vivo oder in vitro. Es handelt sich dabei um eine Selektion von präadaptiven chemoresistenten Mutanten. Um bei den Bakterien in vivo resistente Stämme zu gewinnen, wurden Tierpassagen verwandt, wobei der Resistenzgrad nach Zunahme der dosis curativa (Schmidt, Sesler u. Dettwiler, 1952) oder nach der Überlebenszeit gemessen wurden (Schmidt u. Sesler, 1943). In vitro-Versuche werden in einem Nährmedium durchgeführt, meistens als Passagen mit steigender Wirkstoffkonzentration. In einigen Versuchen gelang es auch resistente Varianten in einem Erhaltungsmedium zu gewinnen bei Expositionszeiten bis zu einem Monat. Mit der "gradient-plate-Methode" (Bryson u. Szybalski, 1952) konnten in einem Ansatz verschiedene Resistenzgrade erzielt werden. Eine ähnliche Methode wandten Klein u. Kimmelman 1946 an, um resistente Stämme in flüssigen Medien zu erhalten. Alle Gewinnungsarten resistenter Varianten sind nur relativ verwertbar, da sie abhängig sind von der Art des untersuchten chemischen Stoffes, dessen Konzentration u. der Art der Mikroorganismen. Bei in vitro-Versuchen muß auch das Testmedium berücksichtigt werden. Im allgemeinen verwendet man Methoden, die ein optimales Wachstum der Testkeime gewährleisten.

Ehrlich nannte Substanzen, die schwer eine Resistenz auslösen, "avid". Man unterscheidet Klassen von Chemotherapeutika, die zu verschiedenen hohen Resistenzgraden führen. Zu erwähnen ist, daß Staphylokokken gegen Pc, Streptomycin und Erythromycin hoch resistent werden können. Die Drogenabhängigkeit ist eine besondere Form der Chemoresistenz. Mit der Aufstellung von Überlebenskurven und der Berücksichtigung der Resistenzverteilung eines Stammes kann man die Art des Resistenzanstiegs einer Population bestimmen. Demerec (1948) unterschied 3 Resistenzmuster: das Vielschrittmuster, das fakultative Einschrittmuster und das obligate Einschrittmuster. Mit dieser Methode kann man für fast jedes Antibiotikum ein charakteristisches Resistenzmuster bekommen (Bryson u. Demerec, 1950).

Wird ein Bakterienstamm mit einem Chemotherapeutikum behandelt, so findet man Zellen mit verschiedenen Resistenzgraden, je nach Art des Antibiotikums, der Mutationsrate und des jeweils typischen Resistenzmusters. Für den Gesamtstamm ist die mittlere Resistenz entscheidend, die z. B. im Dilutionstest mit Pc gegen Staphylokokken als Hemmgrenze der Antibiotikakonzentration ermittelt wird. Um diesen mittleren Resistenzgrad zu verändern, müssen in dem Bakterienstamm durch Mutation entstandene genetisch resistente Varianten vorhanden sein, die durch Selektion hervorgehoben werden. Derartige Populationsänderungen findet man am häufigsten in Medien, in denen das Wachstum durch Umwelteinflüsse zeitlich begrenzt ist. In flüssigen Medien ist dabei die Generationszeit entscheidend, weil die Vermehrung der sensiblen Stämme bedeutend schneller ist als der resistenten (Welsch-Phaenomen). Neben diesem Selektionsmechanismus kann auch die Mutation, deren auslösende Ursache meist unbekannt ist, zu einer Populationsänderung führen. Dies konnte mit der Replica-Methode nachgewiesen werden, während die "sib-selection" eine quantitative Methode zum Nachweis präadaptiver Mutanten ist (Cavalli-Sforza u. Lederberg, 1956). Mit dem Fluktuationstest (Luria u. Delbrück, 1943) kann das spontane Auftreten resistenter Stämme bewiesen werden, ebenso auf vereinfachter Basis mit dem Spreading-Test (Newcombe, 1948). Da das mutierende Gen eine gewisse Stabilität besitzt, konnte man nachweisen, daß bei einem gegebenen Stamm und einer genetisch fixierten Eigenschaft die Mutationsrate ziemlich konstant ist. D.h., daß eine Resistenzsteigerung nicht nur auf den Selektionsmechanismus resistenter Mutanten zurückzuführen ist, sondern auch auf das regelmäßige Auftreten neuer Mutationen. So wurde die mutagene Resistenzentstehung bei Staphylokokken gegen Pc gefunden (Demerec, 1948, Lederberg u. Lederberg, 1952).

Unter dem Einfluß von Mutagenen wie Röntgenstrahlen (Demerec u. Latarjet, 1946), UV-Strahlen,  $H_2O_2$  (Wyss, Clark, Haas u. Stone, 1948) oder carcinogener Stoffe (Demerec, 1949) können auch stabilere Gengruppen mutieren. Diese Mutationsart ist die induzierte Mutation. Die mutative Veränderung einer Zelle braucht nicht sofort nach Einwirkung des Mutagens in Erscheinung zu treten. Das muß in Versuchen berücksichtigt werden. Demerec u. Latarjet (1946) unterschieden zero-point Mutanten von verzögerten Mutanten. Aus dem verzögerten Auftreten der Zellveränderungen könnte man schließen, daß das mutagene Agens über Zwischenstufen wirkt (Auerbach, 1951 u. McElroy, 1952).

Unter der gerichtet induzierten Mutation einer Zelle versteht man die Über-

tragung bestimmter hereditärer Informationen auf den Genotyp einer Zelle. Dies geschieht durch Transformation oder Transduktion. Die Transformation ist gekennzeichnet durch die Änderung von Eigenschaften einer sensiblen Zelle, hervorgerufen durch die Aufnahme genetischer Determinanten (DNS). Es handelt sich um eine sehr spezifische Reaktion. Versuche, in denen mit Hilfe der Transformation die Übertragung einer Chemoresistenz durchgeführt wurde, zeigten eine 10 000 mal größere Zahl Pc-resistenter Zellen als bei der spontanen Mutation. Außerdem konnte mit dieser Methode auch der stufenweise Anstieg der Pc-Resistenz bestätigt werden. Hotchkiss (1957) nahm für den Vorgang der Transformation 2 Möglichkeiten an: den Austausch zwischen großen Parentalteilchen und einer kleineren Transformationseinheit oder die Inkorporierung des transformierenden Teilchens.

Die Transduktion ist die Überführung eines filtrierbaren Agens auf sensible Zellen, wobei eine einzelne Zelle nur eine transduzierende Eigenschaft erwerben kann. Die Träger des filtrierbaren Agens sind Phagen (Zinder u. Lederberg, 1952).

Auch durch Rekombination von Zellen zweier Parentalstämme versuchte man genetische Eigenschaften zu übertragen. In den Rekombinanten wurden Kombinationen der Charakteristika der Parentalstämme gefunden. Diese Erscheinung wurde von Davis (1950) mit einer Transformation erklärt. Sie ermöglichte ausserdem eine relative Genlokalisierung, die auch für Fragen der Chemoresistenz bedeutungsvoll sind.

Ähnlich den Zellen höherer Lebewesen enthalten die Bakterien Elementareinheiten, die die Fähigkeit besitzen, Erbfaktoren zu übertragen und Eiweiß zu synthetisieren. Zu diesen Elementareinheiten wird die Desoxyribonucleinsäure (DNS) gezählt, die in den Nucleoiden liegt. Sie steht in direkter Abhängigkeit zu der Zahl der Chromosomensätze (Vendrely u. Vendrely, 1948, Leuchtenberger, Vendrely u. Vendrely, 1951, Davidson, Leslie u. White, 1951, Thomson, Heagy, Hutchingson u. Davidson, 1953). Sie wird durch physiologische Zellveränderungen nicht beeinflusst. Aus diesen Gründen hält man die DNS für den Träger der genetischen Informationen. Der Nachweis kann u. a. durch mutagenen Effekt (Röntgen, UV-Bestrahlung) oder Bakterientransformation erbracht werden. Wahrscheinlich werden auch die Übergangsformen, die bei der Transformation entstehen, von der DNS getragen. Innerhalb einer Bakterienart zeigt die DNS eine deutliche Spezifität. Mit der Säulenchromatographie (Crampton u. Mitarbeiter 1954) versuchte man die DNS zu fraktionieren, um mit dem molekularen Autoradiogramm (Levinthal, 1955) das Molekulargewicht zu bestimmen. Man stellte die Frage

nach einer möglichen Teilbarkeit der genetischen Information (Pontecorvo, 1958) und untersuchte, wie groß das DNS-Molekül sein muß, bzw. wie klein es sein darf, um noch eine genetische Information zu übertragen. Diese Frage lag nahe, da die DNS-Moleküle einer Zelle verschieden groß sind.

Bei der Vererbung können neben den wichtigen Kernfaktoren auch Faktoren im Cytoplasma eine Rolle spielen, wie die Vererbung bei den Protozoen mit Hilfe von Antiseren zeigte. Es wird vermutet, daß kleine Resistenzerhöhungen bei den Bakterien auch durch einen cytoplasmatischen Mechanismus bedingt sein können.

Außer der Mutation/Selektion kann auch eine milieubedingte Anpassung eine Änderung des Phänotyps über mehrere Generationen herbeiführen. Für diese Adaption beweisend ist die Änderung des Phänotyps bei Ruhezellen und die auffallende Eintönigkeit der Veränderungen.

Ein noch wenig bearbeitetes Problem ist die Verminderung der Chemoresistenz bei Mikroorganismen, da die Erfassung sensibler Varianten sehr schwierig ist und man dauernd mit dem spontanen Auftreten resistenter Mutanten rechnen muß. Um diesen Faktor möglichst gering zu halten, werden die Versuche meistens *in vitro* durchgeführt.

Bryson u. Szybalski (1955) versuchten die Chemoresistenz durch Kombination mehrer Antibiotika und Chemotherapeutika und durch Verminderung eines Drogenantagonismus herabzusetzen. Novick u. Szillard (1952) sahen eine Resistenzverminderung bei bestimmten Nucleosiden, die als Antimutagen wirkten.

Die resistenten Stämme haben bekanntlich eine längere Generationszeit als die sensiblen. Aus diesem Grunde kann man durch genau festgelegte Generationszeiten eine Resistenzverminderung erreichen (Welsch, 1949). Durch Einwirken eines Penasepräparates auf Pc-resistente Staphylokokken erreichte man eine Reduktion resistenter Mutanten (Gillissen, 1957), ebenso durch kristalline DN-ase (Gillissen, 1959).

### 3) MATERIAL UND METHODEN

Als Nährmedium für Bakterien wurden im Verlauf der folgenden Versuchsreihen halbsynthetische Nährböden verwandt:

|                                                 |        |
|-------------------------------------------------|--------|
| Casein Hydrolysat (Bayer)                       | 12,0 g |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck)         | 0,5 g  |
| Mg SO <sub>4</sub> (7 H <sub>2</sub> O) (Merck) | 0,3 g  |
| Ca Cl <sub>2</sub> (Merck)                      | 0,2 g  |
| FeSO <sub>4</sub> (Merck)                       | 0,1 g  |

auf 1000,0 ml Aqua dest.

Einstellung auf pH = 7,3.

Die Lösung wurde 30 min bei + 121°C im Autoclav sterilisiert. Eine dabei entstandene Ausfällung wurde durch Filtration entfernt. Nach jeder Flüssigkeitsentnahme wurde eine Sterilitätsprobe angestellt: 1 ml des halbsynthetischen Nährmediums wurde in Bouillon gegeben, die nach 18-stündiger Bebrütung bei + 37°C auf ein Keimwachstum durch Anlegung von Subkulturen auf Agar untersucht wurde. Natürlich wurden nur sterile Nährbodenchargen benutzt.

Nachfolgend genannte Stoffe wurden auf ihren Einfluß auf die Bakterienphosphatase bzw. (Pc)-Resistenz der Testkeime untersucht:

sekundäres Ammoniumphosphat (NH<sub>4</sub>) HPO<sub>4</sub> (Merck)

sekundäres Kaliumphosphat K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck)

Natriumglycerophosphat (Merck)

Natrium-β-Glycerophosphat (Merck)

Die Phosphorsalze wurden in dem halbsynthetischen Nährmedium aufgelöst.

Durch Weiterverdünnung mit demselben Medium wurden 10, 5, 1 sowie 0,5 und 0,1%ige Lösungen hergestellt. Diese wurden steril filtriert.

Zur Herstellung der Penicillinlösung wurde Standardpenicillin (Höchst) in Aqua dest. steril. auf 100 E/ml H<sub>2</sub>O verdünnt und in gefrorenem Zustand in sterilen Kolben aufbewahrt (Stammlösung).

Als Teststamm diente *M. pyogenes* var. *aureus* Sg 511. Dieser Stamm wird gemeinhin für Pc-Spiegelbestimmungen benutzt und hat eine mittlere Sensibilität von 0,04 E Pc/ml.

Die Resistenzbestimmung erfolgte mit dem Dilutionstest und geometrischen Verdünnungsstufen. Die Impfdosis der Testkeime entsprach 10<sup>-2</sup> von 16 - 18 Stunden alten Bouillonkulturen. Als Testmedium diente hierzu eine Bouillon mit einem Zusatz von 2 - 3% Saccharose und etwas Lackmus. Dadurch konnte ein auftretendes Keimwachstum 1. an der Trübung des Mediums

und 2. an dem Farbumschlag erkannt werden. Die Ablesung der Resultate erfolgte nach 18-stündiger Bebrütung bei 37°C. Als Hemmgrenze wurde die mittlere Pc-Konzentration zwischen dem letzten nicht bewachsenen und dem 1. deutlich bewachsenen Röhrchen der Reihe gerechnet. Zeigte eine Verdünnungsstufe nur ein nicht sicher erkennbares Wachstum, dann wurde die darin enthaltene Pc-Konzentration als Grenzwert angegeben.

Zunächst wurden das sekundäre Ammoniumphosphat, das sekundäre Kaliumphosphat, das Natrium-Glycerophosphat und Na-β-Glycerophosphat ausgetestet. Zu einer Verdünnungsreihe von Penicillin wurde je das gleiche Volumen der Testlösung mit der gleichen Konzentration für eine jede Reihe hinzugegeben. Damit war also die Konzentration der Testsubstanzen konstant, während unterschiedliche Pc-Konzentrationen vorlagen.

In einer weiteren Versuchsserie wurden die Testkeime vorbehandelt. Die Bakterien (Sg 511) wurden an 5 aufeinander folgenden Tagen in Passagen unter Verwendung von halb-synthetischen Medien mit den Testsubstanzen gezüchtet.

Dabei lagen die Testsubstanzen in denselben Konzentrationen vor wie anschließend bei den Dilutionstesten. Die nach diesen Passagen erhaltenen Stämme wurden auf Schrägagar bis zum Verbrauch gehalten.

In einer weiteren Versuchsserie wurde als Testmedium das halbsynthetische Medium, jedoch ohne  $K_2HPO_4$  verwandt, da bei der Austestung des Effektes von Phosphaten ein wesentlicher Fehler auftreten kann, wenn das Medium selbst solche Stoffe enthält.

Bestimmung der sauren Phosphatase.

Verwandte Lösungen:

Glykokoll-Puffer nach Sørensen

pH = 12

Herstellung:

Lösg. A: Glykokoll (Merck) 7,505 g + NaCl (Merck)  
5,35 g auf 1 l Aqua dest. (0,1 n-HCl)

Lösg. B: 0,1 n-NaOH

A + B = 100 ml

46 + 54 = 100 ml

Acetatpuffer

pH = 5,6

Herstellung:

0,79 g Eisessig (Merck) + 11,7 g kristallisiertes Natriumacetat (Merck) auf 1000,0 ml Aqua dest.

Natrium-p-Nitrophenylphosphat (Light & Co.) (NPP) 0,4% (Flasche zu 5g), NPP wurde in Aqua dest. von pH = 5,6 aufgelöst. Diese Lösung diente einerseits für die Versuche und andererseits als Vergleichswert beim Photometrieren nach gleicher Vorbehandlung, wobei lediglich die Keime fehlten.

10 ml des halbsynthetischen Nährmediums, hier mit  $K_2HPO_4$  (s. Rezept), wurden mit dem Sg-Stamm 511 beimpft, der auf Schrägagar in der Kälte aufbewahrt worden war und 16 Stunden bei  $37^{\circ}C$  bebrütet. Die Keime wurden dann 18 min bei 3 500 Umdrehungen/min zentrifugiert und mit Aqua dest. pH = 7,0 gewaschen.

Die Herstellung der gewünschten Keimkonzentration erfolgte nach mikroskopischer Keimzählung. Letztere wurde nach adäquater Vorverdünnung, Zugabe von etwas Methylenblau und Formalin mit der Thomazählkammer durchgeführt. Dabei wurden 3 x 5 große Quadrate ausgezählt und aus dem Mittelwert unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und des Zählkammerinhalts die Keimkonzentrationen der Ausgangssuspension berechnet. Durch Verdünnung mit Aqua dest. wurde die endgültige Keimkonzentration hergestellt.

Untersucht wurde im einzelnen der Einfluß von sekundärem Ammoniumphosphat, sekundärem Kaliumphosphat, Natriumglycerophosphat und Natrium- $\beta$ -Glycerophosphat in verschiedenen Konzentrationen auf die Aktivität der sauren Phosphatase.

Dazu wurden folgende Serien angesetzt:

- a) Halbsynthetisches Nährmedium ohne  $K_2HPO_4$
- b) halbsynthetisches Nährmedium mit sekundärem Ammoniumphosphat
  - 20 ‰
  - 10 ‰
  - 1 ‰
- c) halbsynthetisches Nährmedium mit sekundärem Kaliumphosphat
  - 20 ‰
  - 10 ‰
  - 1 ‰
- d) halbsynthetisches Nährmedium mit Natriumglycerophosphat
  - 20 ‰
  - 10 ‰
  - 1 ‰
- e) halbsynthetisches Nährmedium mit Natrium- $\beta$ -glycerophosphat
  - 20 ‰
  - 10 ‰
  - 1 ‰

Die Keimsuspension wurde zu gleichen Volumenanteilen mit den obigen phosphathaltigen Nährlösungen gemischt. Dann wurden die Gemische 4 Stunden bei  $+ 37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad gehalten, anschließend 18 min bei 3 500 Umdrehungen/min zentrifugiert, ausgewaschen wie oben und mit Aqua dest. steril. pH = 7,0 aufgenommen. Nach der anschließenden Keimzählung wurden die Keime mit Aqua dest. steril. pH = 7,0 auf  $10^{10}$  und  $10^9$  eingestellt.

TABELLE 1

Schematische Darstellung der Versuchsanordnungen

Keime nach Vorbehandlung in

|                                |                     |                             |                            |                        |
|--------------------------------|---------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------|
| sek. Am-<br>monium-<br>phosph. | sek. Ka-<br>liumph. | Natri-<br>umgly-<br>ceroph. | Natri-<br>-gly-<br>ceroph. | halb-<br>syn-<br>thet. |
|--------------------------------|---------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------|

|         |        |          |         |        |          |         |        |          |         |        |          |                 |
|---------|--------|----------|---------|--------|----------|---------|--------|----------|---------|--------|----------|-----------------|
| 10<br>‰ | 5<br>‰ | 0,5<br>‰ | 10<br>‰ | 5<br>‰ | 0,5<br>‰ | 10<br>‰ | 5<br>‰ | 0,5<br>‰ | 10<br>‰ | 5<br>‰ | 0,5<br>‰ | Nährme-<br>dium |
|---------|--------|----------|---------|--------|----------|---------|--------|----------|---------|--------|----------|-----------------|

1,5 ml 0,4% NPP-Lösg. in Aqua dest pH = 5,6  
 +1,0 ml Aqua dest. pH = 5,6  
 +1,0 ml Keimsuspension  $10^{10}$ /ml  
 +2,5 ml Puffer pH = 5,6

1,5 ml 0,4% NPP-Lösg. in Aqua dest. pH = 5,6  
 +1,0 ml Phosphatlösg. in Aqua dest. pH = 5,6  
 in 6-facher Konzentration  
 +1,0 ml Keimsuspension  $10^{10}$ /ml  
 +2,5 ml Puffer pH = 5,6

1,5 ml 0,4% NPP-Lösg. in Aqua dest. pH = 5,6  
 +1,0 ml Aqua dest. pH = 5,6  
 +1,0 ml Keimsuspension  $10^9$ /ml  
 +2,5 ml Puffer pH = 5,6

TABELLE 1  
(Fortsetzung)

| sek. Am-<br>monium-<br>Phosph. | sek. Ka-<br>linph. | Natri-<br>ungly-<br>ceroph. | Natri.-<br>-gly-<br>ceroph. | halb-<br>syn-<br>thet. |     |    |   |     |                 |
|--------------------------------|--------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------|-----|----|---|-----|-----------------|
| 10                             | 5                  | 0,5                         | 10                          | 5                      | 0,5 | 10 | 5 | 0,5 | Nährme-<br>dium |
| ‰                              | ‰                  | ‰                           | ‰                           | ‰                      | ‰   | ‰  | ‰ | ‰   |                 |

1,5 ml 0,4‰NPP-Lösg. in Aqua dest. pH = 5,6  
+1,0 ml Phosphatlösg. in Aqua dest. pH = 5,6

in 6-facher Konzentration

+1,0 ml Keimsuspension 10<sup>9</sup>/ml  
+2,5 ml Puffer pH = 5,6

1,5 ml 0,4‰NPP-Lösg. in Aqua dest. pH = 5,6

+1,0 ml Aqua dest. pH = 5,6

+1,0 ml Aqua dest. pH = 7,0

+2,5 ml Puffer pH = 5,6

1,5 ml 0,4‰NPP-Lösg. in Aqua dest. pH = 5,6

+1,0 ml Phosphatlösg. in Aqua dest. pH = 5,6

+1,0 ml Aqua dest. pH = 7,0

+2,5 ml Puffer pH = 5,6

Tab. 1 ist so zu verstehen, daß bei den in der vertikalen Rubrik angegebenen Versuchsansätzen jeweils die Keime benutzt wurden, die in der Horizontalreihe erwähnt sind. Darüber hinaus wurden in den Versuchsreihen die Phosphatzusätze der Horizontalreihe angewandt.

Die Ansätze wurden 30 min bei 37°C im Wasserbad gehalten, dann wurde bis zu einer deutlichen Gelbfärbung 0,5 molare NaOH hinzugegeben (0,1 - 0,3 ml) und mit Puffer von pH = 12,0 auf insgesamt 10,5 ml aufgefüllt. Die Vorgabe von NaOH erfolgte in Berücksichtigung der Pufferkapazität. Bei allen Ansätzen wurden mit dem pH-Meter die pH-Kontrollen durchgeführt. Die Ansätze wurden dann 15 min bei etwa 600 x g in der Kühlzentrifuge zentrifugiert und die klaren Lösungen im Eppendorf-Photometer mit einer Küvette von 2 cm Schichtdicke bei 405 m $\mu$  photometriert. An Hand einer Eichkurve, die mit p-Nitrophenol hergestellt worden war, wurde aus den Extinktionswerten die pro Volumeneinheit freigesetzte Menge an p-Nitrophenol bestimmt.

Bei der Wiederholung der Versuchsreihe wurde eine frische NPP-Lösung verwandt und die Versuchsanordnung in folgender Weise gemacht:

10 ml des halbsynthetischen Nährmediums mit K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> wurden mit Staph. aureus Sg 511 beimpft, 16 Stunden bei 37°C bebrütet, 18 min bei 3500 Umdrehungen/min in der Kühlzentrifuge gehalten, gewaschen und mit Aqua dest. steril. (pH = 7,0) aufgenommen. Die Keimkonzentration wurde nach der mikroskopischen Keimzählung auf 10<sup>7</sup> eingestellt und dann 1:2 mit den Phosphatlösungen verdünnt, welche in dem Nährmedium ohne K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in doppelter Konzentration gelöst waren. Wie oben beschrieben, wurden die Kulturen 4 Stunden bei 37°C in Wasserbad bebrütet, die Keime zentrifugiert, ausgewaschen, mit Aqua dest. steril. aufgenommen und nach mikroskopischer Keimzählung auf 10<sup>10</sup> und 10<sup>9</sup>/ml eingestellt.

#### 4) BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Die Austestung des Teststammes Sg 511 gegen Penicillin (Pc) in Bouillon als Medium ergab eine Sensibilität von 0,06 E Pc/ml. Die Abweichung von der bekannten Sensibilität dieses Teststammes von 0,04 E Pc/ml darf nach aller üblichen Erfahrung als normaler Fehler angesehen werden. Die Pc-Resistenz, bzw. Pc-Sensibilität des Teststammes wurde ferner in dem halbsynthetischen Medium mit verschiedenen Phosphatzusätzen ausgetestet. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 wiedergegeben.

TABELLE 2

Die Pc-Sensibilität von *M. pyogenes* var. *aureus* Sg 511 in Gegenwart von verschiedenen Phosphatkonzentrationen

| Testsubstanzen                     | Auswertg. | Pc-Kontr. | Konzentrationen d. Testsubstanzen in % |       |       |       |
|------------------------------------|-----------|-----------|----------------------------------------|-------|-------|-------|
|                                    |           |           | 10                                     | 5     | 1     | 0,1   |
| sek. Ammonium-phosphat             | Stase     | 0,046     | -                                      | -     | -     | 0,031 |
|                                    | Subkultur | 0,022     | -                                      | -     | 0,022 | 0,017 |
|                                    | Nährmed.  | 0,062     | 0,046                                  | 0,093 | 0,046 | 0,046 |
| sek. Kalium-phosphat               | Stase     | 0,046     | -                                      | -     | 0,022 | 0,031 |
|                                    | Subkultur | 0,022     | -                                      | 0,046 | 0,046 | 0,022 |
|                                    | Nährmed.  | 0,062     | 0,046                                  | 0,093 | 0,046 | 0,046 |
| Natriumglycero-phosphat            | Stase     | 0,046     | -                                      | 0,09  | 0,031 | 0,022 |
|                                    | Subkultur | 0,022     | -                                      | 0,031 | 0,022 | 0,017 |
|                                    | Nährmed.  | 0,062     | 0,093                                  | 0,125 | 0,046 | 0,046 |
| Natrium- $\beta$ -gly-cerophosphat | Stase     | 0,062     | 0,046                                  | 0,062 | 0,046 | 0,046 |

Aus Tab. 2 ist zu entnehmen, daß eine nennenswerte Änderung in Abhängigkeit der Konzentrationen der einzelnen Phosphate im Dilutionstest nicht aufgetreten ist. Man gewinnt zwar den Eindruck, daß mit zunehmender Phosphatkonzentration auch die Resistenz etwas zunimmt, jedoch liegen die Werte im Rahmen der üblichen Streuweite und können deswegen nicht für eine Deutung herangezogen werden. Allgemein ist zu sagen, daß man die makroskopische Ablesung einer Bakterienstase wegen der gelegentlich durch eine Ausfällung bedingten Trübung nicht heranziehen kann.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Teststamm in den entsprechenden phosphathaltigen Medien über 5 Passagen von je 24 Stunden vorgezüchtet. Mit diesen Stämmen wurden dann erneut die Dilutionsteste angesetzt (Ergebnisse siehe Tab. 3).

TABELLE 3

Pc-Resistenz von *M. pyogenes* var. *aureus* Sg 511 nach  
Vorzüchtung in phosphathaltigen Medien

| Testsubstanzen              | Auswertg. | Pc-Kontr. | Konzentrationen d. Tests. in % |       |       |       |
|-----------------------------|-----------|-----------|--------------------------------|-------|-------|-------|
|                             |           |           | 10                             | 5     | 1     | 0,1   |
| sek. Ammonium-<br>phosphat  | Stase     | 0,09      | -                              | -     | -     | 0,031 |
|                             | Subkultur | 0,09      | < 0,015                        | 0,046 | 0,022 | 0,046 |
| sek. Kalium-<br>phosphat    | Stase     | 0,09      | 0,022                          | 0,031 | 0,046 | 0,046 |
|                             | Subkultur | 0,09      | 0,022                          | 0,046 | 0,046 | 0,046 |
| Natriumgly-<br>cerophosphat | Stase     | 0,09      | 0,093                          | 0,125 | 0,046 | 0,046 |
|                             | Subkultur | 0,09      | 0,093                          | 0,046 | 0,046 | 0,046 |

Aus Tab. 3 ist im Prinzip dasselbe Resultat zu entnehmen, wie es aus den Ergebnissen von Tab. 2 hervorgeht. Danach scheint die Vorzüchtung der Keime in den Phosphaten keinen Einfluss auf die Pc-Resistenz bei Verwendung eines einfachen Dilutionstestes zu haben. Man könnte allenfalls den Eindruck gewinnen, als würde mit zunehmender Konzentration bei Verwendung von sekundärem Ammoniumphosphat ebenso wie bei Verwendung von sekundärem Kaliumphosphat die Sensibilität etwas größer und bei Verwendung von Natriumglycerophosphat etwas kleiner. Dieser Eindruck kann aber lediglich als Hinweis für die Deutung weiterer Versuche gewertet werden.

In einem weiteren Versuch wurden die Testkeime mit und ohne Vorzüchtung in einem phosphathaltigen Nährmedium parallel nochmals ausgetestet. Die Ergebnisse sind in Tab.4 wiedergegeben.

Aus Tab.4 ist im wesentlichen dasselbe zu entnehmen, wie aus den Ergebnissen von Tab.2 u.3. Ergänzend ist lediglich zu sagen, daß man bei Verwendung von Natrium- $\beta$ -glycerophosphat sehr viel höhere Resistenzwerte erhält als bei Verwendung eines Nährmediums, das diese Substanzen nicht enthält. Dieser Befund ist recht auffallend.

Bei den seither beschriebenen Versuchen enthielt das halbsynthetische Medium von vornherein etwas  $K_2HPO_4$ . Deswegen wurden die Dilutionsteste nochmals wiederholt, wobei das Medium an Phosphaten lediglich die Zusätze enthielt, die in Tab.5 angegeben sind.

TABELLE 4

Die Pc-Sensibilität von *M. pyogenes* var. *aureus* Sg 511 mit und ohne Vorzüchtung in einem phosphathaltigen Medium

| Testsubst.                                | Auswertg. | Pc-Kontr.<br>Bouill. | Konzentrationen der Testsubstanzen in % |       |        |             |        |       |        |
|-------------------------------------------|-----------|----------------------|-----------------------------------------|-------|--------|-------------|--------|-------|--------|
|                                           |           |                      | ohne Passage                            |       |        | mit Passage |        |       |        |
|                                           |           |                      | 10                                      | 5     | 1      | 0,1         | 10     | 5     | 1      |
| sek. Ammo-<br>niumphos-<br>phat           | Stase     | 0,031                | <0,015                                  | 0,022 | 3      | 0,015       | <0,015 | 0,015 | <0,015 |
|                                           | Subkult.  | 0,062                | 0,187                                   | 0,187 | 3      | 0,022       | 0,022  | 0,022 | 0,046  |
| sek. Kali-<br>umphosphat                  | Stase     | 0,031                | 0,093                                   | 1     | 0,022  | 0,015       | <0,015 | 0,022 | 0,093  |
|                                           | Subkult.  | 0,062                | 0,022                                   | 1,5   | 0,046  | 0,022       | 0,015  | 0,015 | 0,046  |
| Natrium-<br>glycero-<br>phosphat          | Stase     | 0,031                | 0,031                                   | 0,062 | <0,015 | <0,015      | 0,022  | 0,022 | <0,015 |
|                                           | Subkult.  | 0,062                | 0,022                                   | 0,187 | 0,022  | 0,046       | 0,046  | 0,022 | 0,046  |
| Natrium-<br>$\beta$ -glyce-<br>rophosphat | Stase     | 0,04                 | 0,5                                     | 0,5   | 0,375  | 0,5         | 0,093  | 0,25  | 0,5    |
|                                           | Subkult.  | 0,04                 | >3                                      | 1,5   | 0,093  | 0,062       | 0,187  | 0,375 | 0,375  |

TABELLE 5

Pc-Resistenz von *M. pyogenes* var. *aureus* Sg 511 in  
Gegenwart verschiedener Konzentrationen  
von verschiedenen Phosphaten

| Testsubstanzen                         | Auswertg. | Pc-Kontr. in Konzentrationen d. Testsubstanz in % |          |          |          |
|----------------------------------------|-----------|---------------------------------------------------|----------|----------|----------|
|                                        |           | halbsynthe-<br>tischen Nähr-<br>medium            | 10       | 5        | 0,5      |
| sek. Ammonium-<br>phosphat             | Stase     | 0,0061                                            | < 0,0045 | < 0,0045 | 0,031    |
|                                        | Subkultur | 0,058                                             | 0,234    | 0,0135   | 0,058    |
| sekundäres Ka-<br>liumphosphat         | Stase     | 0,0061                                            | < 0,0045 | < 0,0045 | 0,117    |
|                                        | Subkultur | 0,058                                             | < 0,0045 | 0,0045   | < 0,0045 |
| Natriumglycero-<br>phosphat            | Stase     | 0,0061                                            | 0,078    | 0,028    | 0,0139   |
|                                        | Subkultur | 0,058                                             | 0,058    | 0,058    | 0,0139   |
| Natrium- $\beta$ -gly-<br>cerophosphat | Stase     | 0,0061                                            | 0,234    | 0,117    | 0,039    |
|                                        | Subkultur | 0,058                                             | 0,468    | 0,117    | 0,028    |

Anmerkung:

Bei dieser Versuchsreihe wurde zur Kontrolle der Stamm in dem halbsynthetischen Nährmedium ohne einen Phosphatzusatz ausgetestet. Man kann feststellen, daß die Sensibilität wesentlich größer ist als bei Verwendung von Bouillon. Dies dürfte aber im wesentlichen auf eine kleinere Generationszeit bei gleicher Versuchsdauer zurückzuführen sein.

Auch bei dieser Versuchsserie (Tab. 5) fällt besonders auf, daß bei Verwendung von Natrium- $\beta$ -glycerophosphat die im Dilutionstest gemessene Resistenz von Sg 511 wesentlich zugenommen hat.

In Tab. 6 sind alle Ergebnisse der Dilutionsteste nochmals zusammengefaßt.

TABELLE 6

## Zusammenfassende Darstellung aller Dilutionsteste

| Test-Ver-<br>subst. suchs-<br>serie Nr. | Auswertg. | Pc. -K.<br>in    | Konzentrationen der Testsubstanzen in % |        |             |             |                          |
|-----------------------------------------|-----------|------------------|-----------------------------------------|--------|-------------|-------------|--------------------------|
|                                         |           |                  | ohne Passage                            |        | mit Passage |             |                          |
|                                         |           |                  | 10                                      | 5      | 1           | 0,1         | 0,5 10 5 1 0,1           |
| <hr/>                                   |           |                  |                                         |        |             |             |                          |
| 1                                       | Stase     | Nährm.<br>0,049  | -                                       | 0,125  | 0,06        | 0,06        |                          |
| <hr/>                                   |           |                  |                                         |        |             |             |                          |
| 2                                       | Stase     | Nährm.<br>0,046  | -                                       | -      | -           | 0,031       |                          |
|                                         | Subkult.  | 0,022            | -                                       | -      | 0,022       | 0,017       |                          |
|                                         | Stase     | 0,062            | 0,046                                   | 0,013  | 0,046       | 0,046       |                          |
| <hr/>                                   |           |                  |                                         |        |             |             |                          |
| 3                                       | Stase     | Bouill.<br>0,09  |                                         |        |             |             | 0,031                    |
|                                         | Subkult.  | 0,09             |                                         |        |             | 0,015 0,046 | 0,022 0,046              |
| <hr/>                                   |           |                  |                                         |        |             |             |                          |
| 4                                       | Stase     | Bouill.<br>0,031 | < 0,015                                 | 0,022  | 3           | 0,015       | < 0,018 0,015 0,015 0,03 |
|                                         | Subkult.  | 0,062            | 0,187                                   | 0,187  | 3           | 0,022       | 0,022 0,046 0,046 0,046  |
| <hr/>                                   |           |                  |                                         |        |             |             |                          |
| 5                                       | Stase     | Nährm.<br>0,061  | < 0,0045                                | 0,0045 |             | 0,031       |                          |
|                                         | Subkult.  | 0,058            | 0,234                                   | 0,013  |             | 0,058       |                          |
| <hr/>                                   |           |                  |                                         |        |             |             |                          |

sekundäres Ammoniumphosphat

TABELLE 6  
(Fortsetzung)

| Test-<br>subst. | Ver-<br>suchs-<br>serie Nr | Auswertg. | Pc. -K.<br>in    | Konzentrationen der Testsubstanzen in % |         |       |         |        |       |       |       |     |  |
|-----------------|----------------------------|-----------|------------------|-----------------------------------------|---------|-------|---------|--------|-------|-------|-------|-----|--|
|                 |                            |           |                  | 10                                      | 5       | 1     | 0,1     | 0,5    | 10    | 5     | 1     | 0,1 |  |
|                 | 1                          | Stase     | Nährm.<br>0,046  | 0,093                                   | 0,25    | 0,125 | 0,062   |        |       |       |       |     |  |
|                 | 2                          | Stase     | Nährm.<br>0,046  | -                                       | -       | 0,022 | 0,031   |        |       |       |       |     |  |
|                 |                            | Subkult.  | 0,022            | -                                       | 0,046   | 0,046 | 0,022   |        |       |       |       |     |  |
|                 |                            | Stase     | 0,062            | 0,046                                   | 0,046   | 0,062 | 0,062   |        |       |       |       |     |  |
|                 | 3                          | Stase     | Bouill.<br>0,09  |                                         |         |       |         |        |       |       |       |     |  |
|                 |                            | Subkult.  | 0,09             |                                         |         |       |         |        |       |       |       |     |  |
|                 |                            |           |                  |                                         |         |       | 0,022   | 0,031  | 0,046 | 0,046 |       |     |  |
|                 | 4                          | Stase     | Bouill.<br>0,031 | 0,093                                   | 1       | 0,022 | 0,015   | <0,015 | 0,022 | 0,093 | 0,031 |     |  |
|                 |                            | Subkult.  | 0,062            | 0,022                                   | 1,5     | 0,046 | 0,022   | 0,015  | 0,015 | 0,046 | 0,046 |     |  |
|                 | 5                          | Stase     | Nährm.<br>0,0061 | <0,0045                                 | <0,0045 |       |         |        |       |       |       |     |  |
|                 |                            | Subkult.  | 0,058            | <0,0045                                 | 0,0045  |       |         |        |       |       |       |     |  |
|                 |                            |           |                  |                                         |         |       | 0,117   |        |       |       |       |     |  |
|                 |                            |           |                  |                                         |         |       | <0,0045 |        |       |       |       |     |  |

sekundäres Kaliumphosphat

TABELLE 6  
(Fortsetzung)

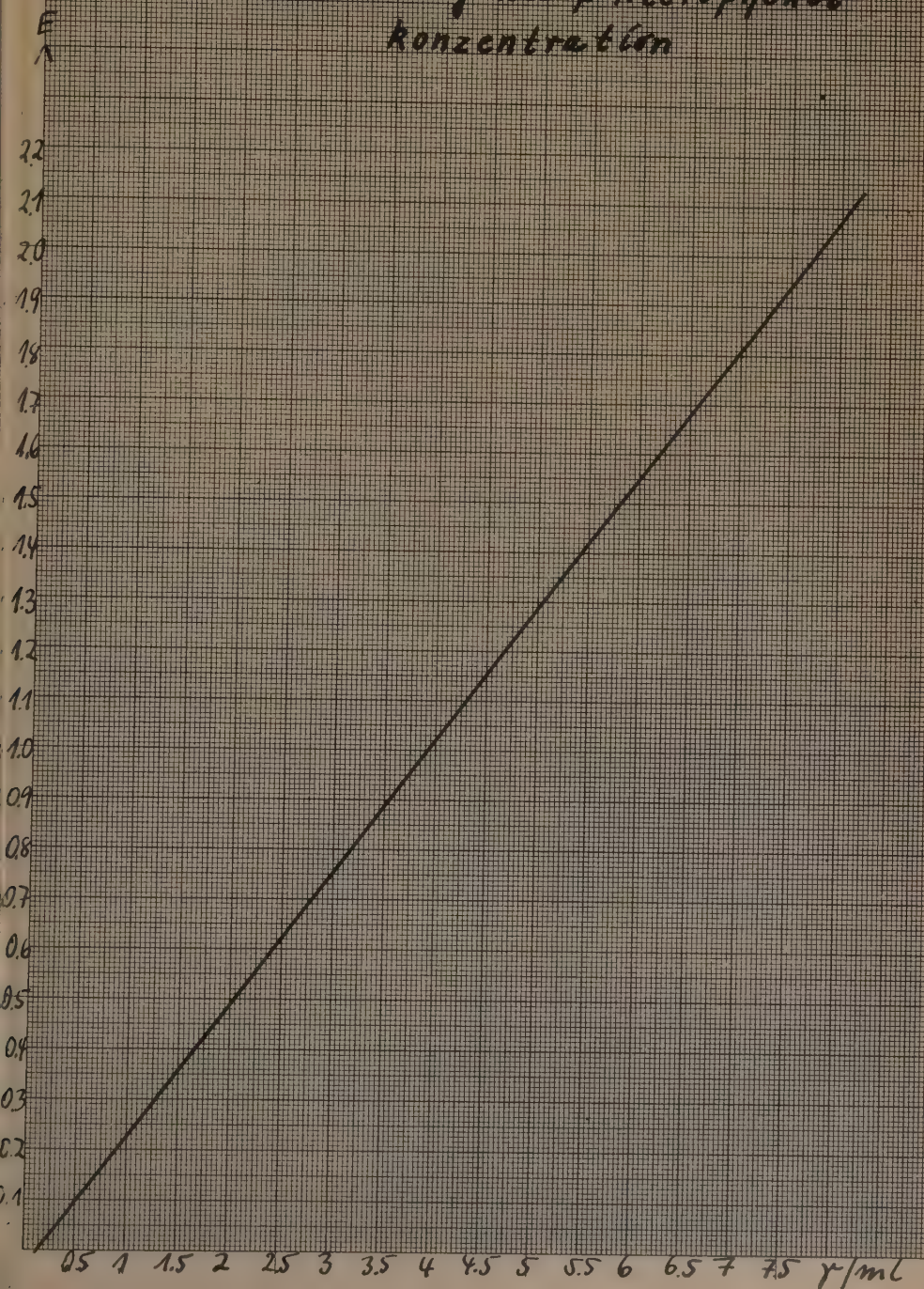
| Test-<br>subst. | Ver-<br>suchs-<br>serie Nr. | Auswertg.<br>in | Pc-K.  | Konzentrationen der Testsubstanzen in % |       |        |        |       |       |             |
|-----------------|-----------------------------|-----------------|--------|-----------------------------------------|-------|--------|--------|-------|-------|-------------|
|                 |                             |                 |        | ohne Passage                            | 1     | 0,1    | 0,5    | 10    | 5     | mit Passage |
|                 |                             |                 |        | 10                                      | 5     |        |        |       |       | 1           |
|                 |                             |                 |        |                                         |       |        |        |       |       | 0,1         |
|                 |                             |                 | Nährm. |                                         |       |        |        |       |       |             |
|                 | 2                           | Stase           | 0,046  | -                                       | 0,09  | 0,031  | 0,022  |       |       |             |
|                 |                             | Subkult.        | 0,022  | -                                       | 0,031 | 0,022  | 0,017  |       |       |             |
|                 |                             | Stase           | 0,062  | 0,093                                   | 0,125 | 0,046  | 0,046  |       |       |             |
|                 |                             | Bouill.         |        |                                         |       |        |        |       |       |             |
|                 | 3                           | Stase           | 0,09   |                                         |       |        |        | 0,093 | 0,125 | 0,046       |
|                 |                             | Subkult.        | 0,09   |                                         |       |        |        | 0,093 | 0,046 | 0,046       |
|                 |                             | Bouill.         |        |                                         |       |        |        |       |       |             |
|                 | 4                           | Stase           | 0,031  | 0,031                                   | 0,062 | <0,001 | <0,001 | 0,022 | 0,022 | <0,001      |
|                 |                             | Subkult.        | 0,062  | 0,022                                   | 0,187 | 0,022  | 0,046  | 0,046 | 0,022 | 0,046       |
|                 |                             | Nährm.          |        |                                         |       |        |        |       |       |             |
|                 | 5                           | Stase           | 0,0061 | 0,078                                   | 0,028 |        |        |       |       | 0,013       |
|                 |                             | Subkult         | 0,058  | 0,058                                   | 0,058 |        |        |       |       | 0,013       |

Natriumphosphat

TABELLE 6  
(Fortsetzung)

| Testsub-<br>stanz         | Ver-<br>suchs-<br>serie Nr. | Auswertg.   | Pc-K.<br>in | Konzentrationen der Testsubstanzen in % |       |       |       |       |       |       |       |       |  |
|---------------------------|-----------------------------|-------------|-------------|-----------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
|                           |                             |             |             | 10                                      | 5     | 1     | 0,1   | 0,5   | 10    | 5     | 1     | 0,1   |  |
| Natrium-β-Glycerophosphat |                             |             |             |                                         |       |       |       |       |       |       |       |       |  |
| <hr/>                     |                             |             |             |                                         |       |       |       |       |       |       |       |       |  |
| 2                         |                             | Stase       | Nährm.      | 0,062                                   | 0,046 | 0,062 | 0,046 | 0,046 |       |       |       |       |  |
| <hr/>                     |                             |             |             |                                         |       |       |       |       |       |       |       |       |  |
| 3                         |                             | ausgefallen |             |                                         |       |       |       |       |       |       |       |       |  |
| <hr/>                     |                             |             |             |                                         |       |       |       |       |       |       |       |       |  |
| 4                         |                             | Stase       | Bouill.     | 0,04                                    | 0,5   | 0,5   | 0,375 | 0,5   | 0,093 | 0,25  | 0,5   | 2,5   |  |
|                           |                             | Subkult.    |             | 0,04                                    | > 3   | 1,5   | 0,093 | 0,062 | 0,187 | 0,375 | 0,375 | 0,375 |  |
| <hr/>                     |                             |             |             |                                         |       |       |       |       |       |       |       |       |  |
| 5                         |                             | Stase       | Nährm.      | 0,0061                                  | 0,234 | 0,117 |       | 0,039 |       |       |       |       |  |
|                           |                             | Subkult.    |             | 0,058                                   | 0,468 | 0,117 |       | 0,028 |       |       |       |       |  |

Abb. 1 Eichkurve zur photometrischen  
Bestimmung der p-Nitrophenol-  
konzentration





Für die Bestimmung der sauren Phosphatase wurde zunächst mit p-Nitrophenol eine Eichkurve angelegt. Diese Eichkurve ist in Abbildung 1 wiedergegeben.

In einer 1. Versuchsserie wurden die Keime wie oben beschrieben 4 Stunden lang in dem halbsynthetischen Medium mit einem Zusatz von sekundärem Ammoniumphosphat (bzw. sekundärem Kaliumphosphat, Na-Glycerophosphat und Na- $\beta$ -Glycerophosphat), dann abzentrifugiert, gewaschen und in mikroskopischer Keimzählung auf  $10^{10}$  und  $10^9$  Keime pro ml eingestellt. Beim Fermentansatz wurde diesen Keimen (genaue Mengenangaben siehe oben) Aqua dest. oder sekundäres Ammoniumphosphat bzw. die anderen Phosphate in derselben Endkonzentration zugegeben, in der die Keime vorgezüchtet worden waren. Diese Versuchsserie wurde noch 3 mal wiederholt (Versuch 2-4). Die Ergebnisse sind in Tab. 7 wiedergegeben.

TABELLE 7

Einfluß von sekundärem Ammoniumphosphat auf die Aktivität der sauren Phosphatase

| Versuchs-Nr. | Vorzüchtung in Phosphat % | Ansatz Keimzahl | Zusatz     | Extinktionswert | p-Nitrophenol pro Gesamt-Volumen = pro Keimzahl |
|--------------|---------------------------|-----------------|------------|-----------------|-------------------------------------------------|
| 1            | 20                        | $10^{10}$       | Aqua dest. | -               | -                                               |
|              |                           | $10^9$          | "          | -               | -                                               |
|              |                           | $10^{10}$       | Wirkstoff  | 0,88            | 36,225                                          |
|              |                           | $10^9$          | "          | 0,09            | 5,04                                            |
|              | 10                        | $10^{10}$       | Aqua dest. | 0,095           | 5,25                                            |
|              |                           | $10^9$          | "          | -               | -                                               |
|              |                           | $10^{10}$       | Wirkstoff  | 0,09            | 5,04                                            |
|              |                           | $10^9$          | "          | 0,0             | 1,31                                            |
|              | 1                         | $10^{10}$       | Aqua dest. | 0,1             | 5,25                                            |
|              |                           | $10^9$          | "          | 0,002           | 1,365                                           |
|              |                           | $10^{10}$       | Wirkstoff  | 0,05            | 3,045                                           |
|              |                           | $10^9$          | "          | -               | -                                               |
| Nährmedium   |                           | $10^{10}$       | Aqua dest. | 0,045           | 2,625                                           |
|              |                           | $10^9$          | "          | -               | -                                               |

TABELLE 7  
(Fortsetzung)

| Versuchs-<br>Nr. | Vorzüchtung<br>in Phosphat<br>‰ | Ansatz<br>Keimzahl | Zusatz     | Extinktions-<br>wert | p-Nitrophenol pro<br>Gesamt-Volumen =<br>pro Keimzahl |
|------------------|---------------------------------|--------------------|------------|----------------------|-------------------------------------------------------|
| 2                | 20                              | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,05                 | 3,15                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | -                    | -                                                     |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,68                 | 28,3                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,065                | 4,725                                                 |
|                  | 10                              | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,17                 | 8,4                                                   |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,003                | 1,31                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,4                  | 17,325                                                |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,018                | 1,365                                                 |
|                  | 1                               | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,115                | 6,3                                                   |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,017                | 1,365                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,38                 | 16,8                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,04                 | 3,15                                                  |
|                  | Nährmedium                      | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,18                 | 8,4                                                   |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,04                 | 3,15                                                  |
| 3                | 20                              | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,015                | 1,365                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,009                | 1,32                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,225                | 9,89                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,028                | 1,47                                                  |
|                  | 10                              | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,012                | 1,37                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,0                  | 1,31                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,05                 | 3,46                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,004                | 1,32                                                  |
|                  | 1                               | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,02                 | 1,395                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,01                 | 1,365                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,05                 | 3,46                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,003                | 1,31                                                  |
|                  | Nährmedium                      | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,078                | 4,3                                                   |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,008                | 1,35                                                  |

TABELLE 7 (Fortsetzung)

| Versuchs-<br>Nr. | Vorzüchtung<br>in Phosphat<br>‰ | Ansatz<br>Keimzahl | Zusatz     | Extinktions-<br>wert | p-Nitrophenol pro<br>Gesamt-Volumen =<br>pro Keimzahl |
|------------------|---------------------------------|--------------------|------------|----------------------|-------------------------------------------------------|
| 4                | 20                              | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | -                    | -                                                     |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | -                    | -                                                     |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,385                | 16,8                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,04                 | 3,15                                                  |
|                  | 10                              | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,125                | 6,405                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,03                 | 2,62                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,2                  | 9,24                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,015                | 1,4385                                                |
|                  | 1                               | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,095                | 5,04                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,01                 | 1,365                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,155                | 8,1                                                   |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,01                 | 1,365                                                 |
|                  | Nährmedium                      | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,135                | 6,825                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,015                | 1,4385                                                |

TABELLE 8

Einfluß von sekundärem Kaliumphosphat auf die  
Aktivität der sauren Phosphatase

| Versuchs-<br>Nr. | Vorzüchtung<br>in Phosphat<br>‰ | Ansatz<br>Keimzahl | Zusatz     | Extinktions-<br>wert | p-Nitrophenol pro<br>Gesamt-Volumen =<br>pro Keimzahl |
|------------------|---------------------------------|--------------------|------------|----------------------|-------------------------------------------------------|
| 1                | 20                              | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | -                    | -                                                     |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | -                    | -                                                     |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | -                    | -                                                     |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | -                    | -                                                     |
|                  | 10                              | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 1,18                 | 49,875                                                |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,22                 | 9,975                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,72                 | 29,4                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,082                | 4,725                                                 |
|                  | 1                               | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,26                 | 11,55                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,02                 | 2,31                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,5                  | 21,525                                                |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,08                 | 4,725                                                 |
|                  | Nährmedium                      | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,065                | 4,725                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,03                 | 0,315                                                 |

TABELLE 8  
(Fortsetzung)

| Versuchs-<br>Nr. | Vorzüchtung<br>in Phosphat<br>‰ | Ansatz<br>Keimzahl | Zusatz     | Extinktions-<br>wert | p-Nitrophenol pro<br>Gesamt-Volumen =<br>pro Keimzahl |
|------------------|---------------------------------|--------------------|------------|----------------------|-------------------------------------------------------|
| 2                | 20                              | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,11                 | 5,75                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | -                    | -                                                     |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | -                    | -                                                     |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | -                    | -                                                     |
|                  | 10                              | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,16                 | 7,875                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,02                 | 2,3                                                   |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,32                 | 15,725                                                |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,15                 | 6,825                                                 |
|                  | 1                               | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,8                  | 36,2                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,095                | 5,25                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,145                | 6,825                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,015                | 2,3                                                   |
|                  | Nährmedium                      | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,17                 | 7,875                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,03                 | 2,625                                                 |
| 3                | 20                              | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,04                 | 2,94                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,0                  | 1,31                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,12                 | 6,3                                                   |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,015                | 1,4                                                   |
|                  | 10                              | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,25                 | 11,55                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,025                | 1,47                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,4                  | 17,32                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,01                 | 1,365                                                 |
|                  | 1                               | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,235                | 10,5                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,01                 | 1,365                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,08                 | 4,725                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,005                | 1,33                                                  |
|                  | Nährmedium                      | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,12                 | 6,3                                                   |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,01                 | 1,365                                                 |

| Versuchs-<br>Nr. | Vorzüchtung<br>in Phosphat<br>‰ | Ansatz<br>Keimzahl | Zusatz     | Extinktions-<br>wert | p-Nitrophenol pro<br>Gesamt-Volumen=<br>pro Keimzahl |
|------------------|---------------------------------|--------------------|------------|----------------------|------------------------------------------------------|
| 4                | 20                              | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,05                 | 3,46                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,005                | 1,325                                                |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,255                | 13,02                                                |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,04                 | 3,15                                                 |
|                  | 10                              | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,187                | 8,715                                                |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,02                 | 2,3                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,385                | 16,8                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,03                 | 2,62                                                 |
|                  | 1                               | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,195                | 9,24                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,035                | 2,835                                                |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff. | 0,14                 | 6,825                                                |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,01                 | 1,365                                                |
|                  | Nährmedium                      | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,135                | 6,825                                                |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,015                | 1,4385                                               |

TABELLE 9

Einfluß von Natriumglycerophosphat auf die Aktivität  
der sauren Phosphatase

| Versuchs-<br>Nr. | Vorzüchtung<br>in Phosphat<br>‰ | Ansatz<br>Keimzahl | Zusatz     | Extinktions-<br>wert | p-Nitrophenol pro<br>Gesamt-Volumen=<br>pro Keimzahl |
|------------------|---------------------------------|--------------------|------------|----------------------|------------------------------------------------------|
| 1                | 20                              | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | -                    | -                                                    |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | -                    | -                                                    |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | -                    | -                                                    |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | -                    | -                                                    |
|                  | 10                              | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,005                | 1,33                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | -                    | -                                                    |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,07                 | 4,725                                                |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,005                | 1,33                                                 |
|                  | 1                               | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,06                 | 4,2                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,004                | 1,32                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,02                 | 2,3                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | -                    | -                                                    |

TABELLE 9 (Fortsetzung)

| Versuchs-<br>Nr. | Vorzüchtung<br>in Phosphat<br>‰ | Ansatz<br>Keimzahl | Zusatz     | Extinktions-<br>wert | p-Nitrophenol pro<br>Gesamt-Volumen =<br>pro Keimzahl |
|------------------|---------------------------------|--------------------|------------|----------------------|-------------------------------------------------------|
|                  | Nährmedium                      | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,065                | 4,725                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,005                | 1,33                                                  |
| 2                | 20                              | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,165                | 7,875                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,005                | 1,33                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,6                  | 25,2                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,08                 | 4,6                                                   |
|                  | 10                              | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,17                 | 7,875                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,015                | 1,365                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,6                  | 25,2                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,075                | 4,25                                                  |
|                  | 1                               | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,17                 | 7,875                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,015                | 1,365                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,38                 | 16,8                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,055                | 3,15                                                  |
|                  | Nährmedium                      | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,152                | 7,8                                                   |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,017                | 1,47                                                  |
| 3                | 20                              | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,18                 | 8,4                                                   |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,02                 | 2,3                                                   |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,1                  | 1,05                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,016                | 1,365                                                 |
|                  | 10                              | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,19                 | 8,925                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,05                 | 3,46                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | -                    | -                                                     |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | -                    | -                                                     |
|                  | 1                               | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,22                 | 9,975                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,03                 | 2,62                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,425                | 18,8                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,04                 | 3,15                                                  |
|                  | Nährmedium                      | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,134                | 7,14                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,01                 | 1,365                                                 |

TABELLE 9  
(Fortsetzung)

| Versuchs-<br>Nr. | Vorzüchtung<br>in Phosphat<br>‰ | Ansatz<br>Keimzahl | Zusatz     | Extinktions-<br>wert | p-Nitrophenol pro<br>Gesamt-Volumen =<br>pro-Keimzahl |
|------------------|---------------------------------|--------------------|------------|----------------------|-------------------------------------------------------|
| 4                | 20                              | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,085                | 8,925                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,005                | 1,325                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,12                 | 6,3                                                   |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,005                | 1,325                                                 |
|                  | 10                              | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,07                 | 4,2                                                   |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,005                | 1,325                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,11                 | 5,75                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,01                 | 1,365                                                 |
|                  | 1                               | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,225                | 9,89                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,04                 | 3,15                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,395                | 17,32                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,03                 | 2,62                                                  |
|                  | Nährmedium                      | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,145                | 7,41                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,02                 | 2,3                                                   |

TABELLE 10

Einfluß von Natrium- $\beta$ -glycerophosphat auf die  
Aktivität der sauren Phosphatase

| Versuchs-<br>Nr. | Vorzüchtung<br>in Phosphat<br>‰ | Ansatz<br>Keimzahl | Zusatz     | Extinktions-<br>wert | p-Nitrophenol pro<br>Gesamt-Volumen =<br>pro Keimzahl |
|------------------|---------------------------------|--------------------|------------|----------------------|-------------------------------------------------------|
| 1                | 20                              | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | -                    | -                                                     |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | -                    | -                                                     |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | -                    | -                                                     |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | -                    | -                                                     |
|                  | 10                              | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,325                | 14,385                                                |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,05                 | 3,1                                                   |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 1,345                | 54,6                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,02                 | 2,3                                                   |
|                  | 1                               | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,25                 | 11,55                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,0                  | 1,31                                                  |

TABELLE 10  
(Fortsetzung)

| Versuchs-<br>Nr. | Vorzüchtung<br>in Phosphat<br>‰ | Ansatz<br>Keimzahl | Zusatz     | Extinktions-<br>wert | p-Nitrophenol pro<br>Gesamt-Volumen =<br>pro Keimzahl |
|------------------|---------------------------------|--------------------|------------|----------------------|-------------------------------------------------------|
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,035                | 2,625                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | -                    | -                                                     |
|                  | Nährmedium                      | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,058                | 4,2                                                   |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | -                    | -                                                     |
| 2                | 20                              | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | -                    | -                                                     |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | -                    | -                                                     |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,05                 | 3,46                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,0                  | 1,31                                                  |
|                  | 10                              | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,03                 | 2,625                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,0065               | 1,32                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,235                | 11,55                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,1                  | 1,33                                                  |
|                  | 1                               | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,485                | 20,475                                                |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,045                | 2,94                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,65                 | 2,848                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,075                | 4,24                                                  |
|                  | Nährmedium                      | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,05                 | 3,46                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,005                | 1,33                                                  |
| 3                | 20                              | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,014                | 1,37                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,006                | 1,33                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,036                | 2,79                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,004                | 1,39                                                  |
|                  | 10                              | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | -                    | -                                                     |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | -                    | -                                                     |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,04                 | 3,15                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,005                | 1,325                                                 |
|                  | 1                               | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,12                 | 6,3                                                   |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,03                 | 2,62                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,185                | 8,925                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,0                  | 1,31                                                  |
|                  | Nährmedium                      | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,095                | 5,25                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,01                 | 1,365                                                 |

TABELLE 10  
(Fortsetzung)

| Versuchs-<br>Nr. | Vorzüchtung<br>in Phosphat<br>‰ | Ansatz<br>Keimzahl | Zusatz     | Extinktions-<br>wert | p-Nitrophenol pro<br>Gesamt-Volumen =<br>pro Keimzahl |
|------------------|---------------------------------|--------------------|------------|----------------------|-------------------------------------------------------|
| 4                | 20                              | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,0                  | 1,31                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | -                    | -                                                     |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,015                | 1,4385                                                |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,005                | 1,385                                                 |
|                  | 10                              | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,023                | 2,35                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,01                 | 1,365                                                 |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,034                | 2,94                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,003                | 1,31                                                  |
|                  | 1                               | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,115                | 6,61                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,03                 | 2,62                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Wirkstoff  | 0,375                | 16,275                                                |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,03                 | 2,62                                                  |
| Nährmedium       |                                 | 10 <sup>10</sup>   | Aqua dest. | 0,145                | 7,41                                                  |
|                  |                                 | 10 <sup>9</sup>    | "          | 0,02                 | 2,3                                                   |

Die Auswertung der in Tab. 7 - 10 wiedergegebenen Resultate ist in dieser Weise nur schwer möglich. Deswegen wurden die Mittelwerte gegenübergestellt.

Dies geschah einmal dadurch, daß die Mittelwerte, die nach verschiedenartiger Vorzüchtung der Keime dadurch erhalten worden waren, daß im Fermentansatz außer dem Substrat NPP kein anderes Phosphat vorhanden war, graphisch aufgezeichnet wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2-5 wiedergegeben. Diese Wiedergabe erlaubt eine Aussage über die Bedeutung einer gegebenen Vorbehandlung der Keime für die Größe der Phosphataseaktivität.

Aus Tab. 7-10 bzw. Abb. 2-5 ist zu entnehmen, daß besonders bei einer Vorbehandlung der Keime mit Natrium- $\beta$ -glycerophosphat und sekundärem Kaliumphosphat mit einer Zunahme der Konzentration dieser Stoffe die Phosphataseaktivität dieser Zellen zunächst ansteigt, bei der höchsten Konzentration aber wieder abfällt. Dies ist weniger ausgeprägt bei Verwendung von sekundärem Ammoniumphosphat oder von Natriumglycerophosphat.

Da die Werte im einzelnen Versuch natürlich einer gewissen Schwankung unterliegen und die Zahl der Versuchsserien dadurch verhältnismäßig klein ist, ist eine statistische Auswertung nicht möglich. Andererseits wurden aber alle Versuchsserien immer im doppelten Ansatz mit 2 verschiedenen Keimkonzentrationen angesetzt. Es zeigte sich, daß man mit verschiedenen Keimkonzentrationen zu einer prinzipiell gleichen Aussage über die Bedeutung der Vorbehandlung der Keime gelangt.

Aus den in Tab. 7-10 wiedergegebenen Resultaten läßt sich aber noch ein weiterer Vergleich ableiten. Vergleicht man die mittleren prozentualen Abweichungen der Phosphataseaktivität bei gleich vorbehandelten Keimen in Gegenwart der verschiedenen Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen gegenüber den Werten, die in Abwesenheit dieser Testsubstanzen festgestellt wurden, dann erhält man das in Abb. 6-9 wiedergegebene Resultat. Aus Abb. 6-9 ist zu ersehen, daß das Ergebnis noch sehr viel deutlicher ist, wenn man die mittlere prozentuale Abweichung der Phosphatasewerte von der jeweiligen Aqua dest.-Kontrolle graphisch aufzeichnet. Allerdings stimmen hierbei die Ergebnisse, die mit verschiedenen Keimzahlen ermittelt wurden, nicht immer überein.

Verwendet man  $10^{10}$  Keime, dann steigt mit sekundärem Ammoniumphosphat die Phosphataseaktivität wesentlich an. Mit sekundärem Kaliumphosphat ist mit der kleinsten Konzentration von  $1\text{ g/ml}$  eine geringe Abnahme, bei höheren Konzentrationen aber wiederum eine deutliche Zunahme zu sehen. Mit Natriumglycerophosphat, sowie Natrium- $\beta$ -glycerophosphat steigt die Phosphataseaktivität zunächst deutlich an, um bei der höchsten Dosis von  $20\text{ g/ml}$  in beiden Fällen wieder abzusinken. Bei Verwendung von  $10^9$  Keimen im Ansatz sind die Werte verhältnismäßig klein. Bei der relativ großen Streuung der Ergebnisse dürfen diese Werte wenig verwendbar sein, da sie zum großen Teil in den Streubereich fallen.

## 5) DISKUSSION

Die Ergebnisse sind bei jeweils 4-fachem Ansatz aller Versuchsserien prinzipiell gleichgerichtet. Man kann daraus berechtigterweise schließen, daß die Aussagen aus einem Vergleich der jeweiligen Mittelwerte gültig sind. Es steht aber nicht zu erwarten, daß man in jedem Fall eine statistische Signifikanz der Mittelwertvergleiche rechnerisch sichert.

Abb. 2 Mittelwerte aus allen Ansätzen  
I. sek. Ammoniumphosphat

y-p-Nitrophenol/Gesamt-Ansatz

Keimzahl  $10^{10}$

$n = 2$

$n = 4$

$n = 4$

$n = 4$

$n = 4$

$n = 3$

$n = 4$

$n = 3$

20

10

1

1

20

10

1

1

Vorzüchtung in 1/100 sek. Ammoniumphosphat, im Ansatz ca. 0,01% Näm.

# $\gamma$ -p-Nitrophenol/Gesamt-Ansatz

Abb 3 Mittelwerte aus allen Analysen  
D. sek. Kaliumphosphat

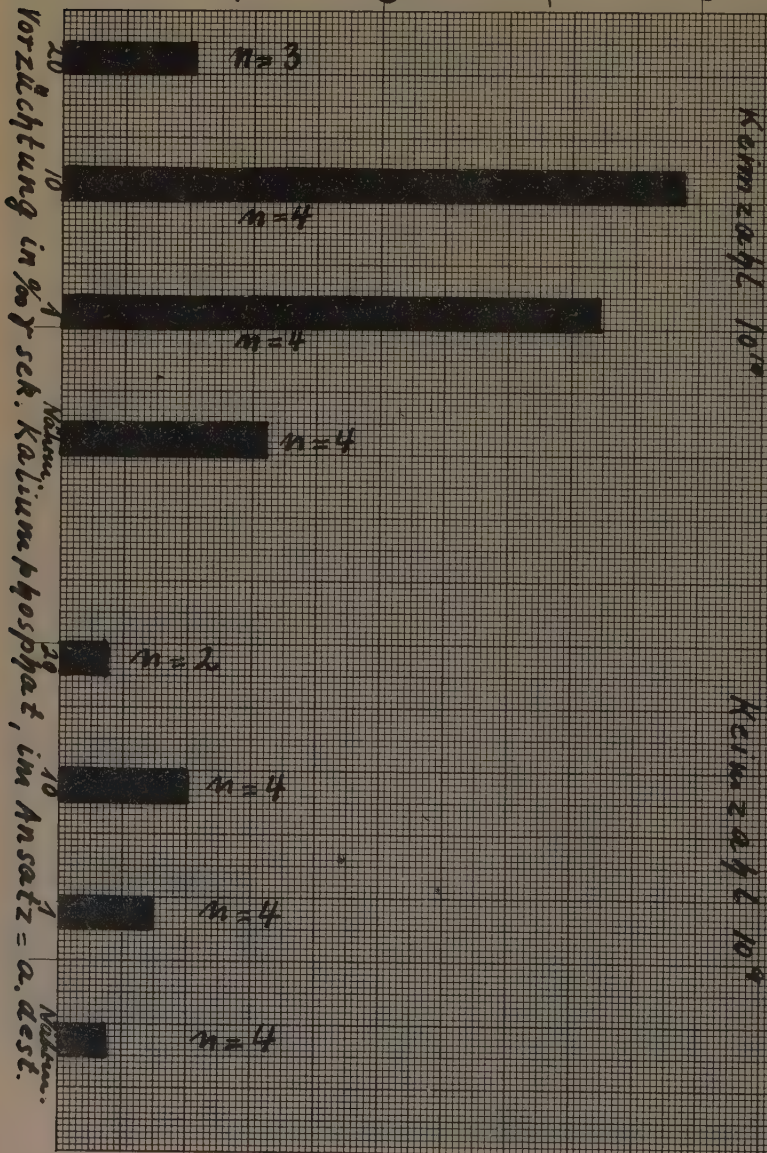
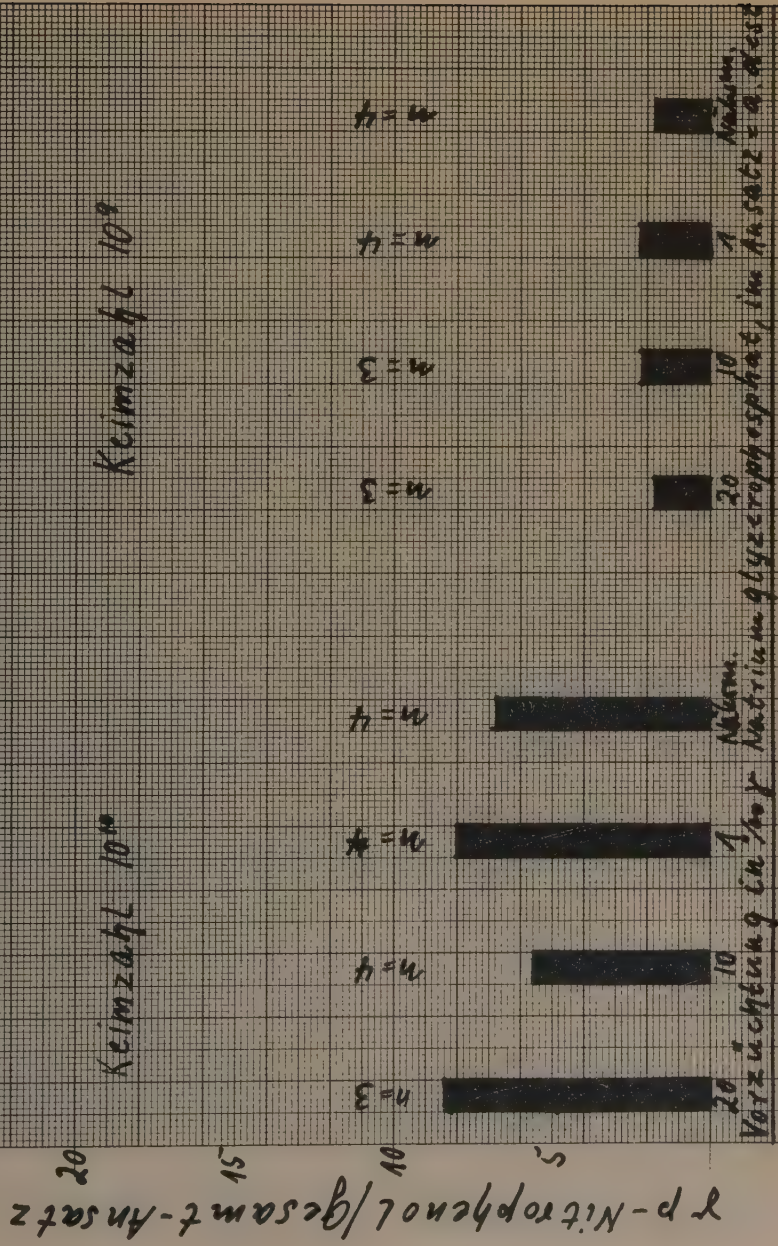
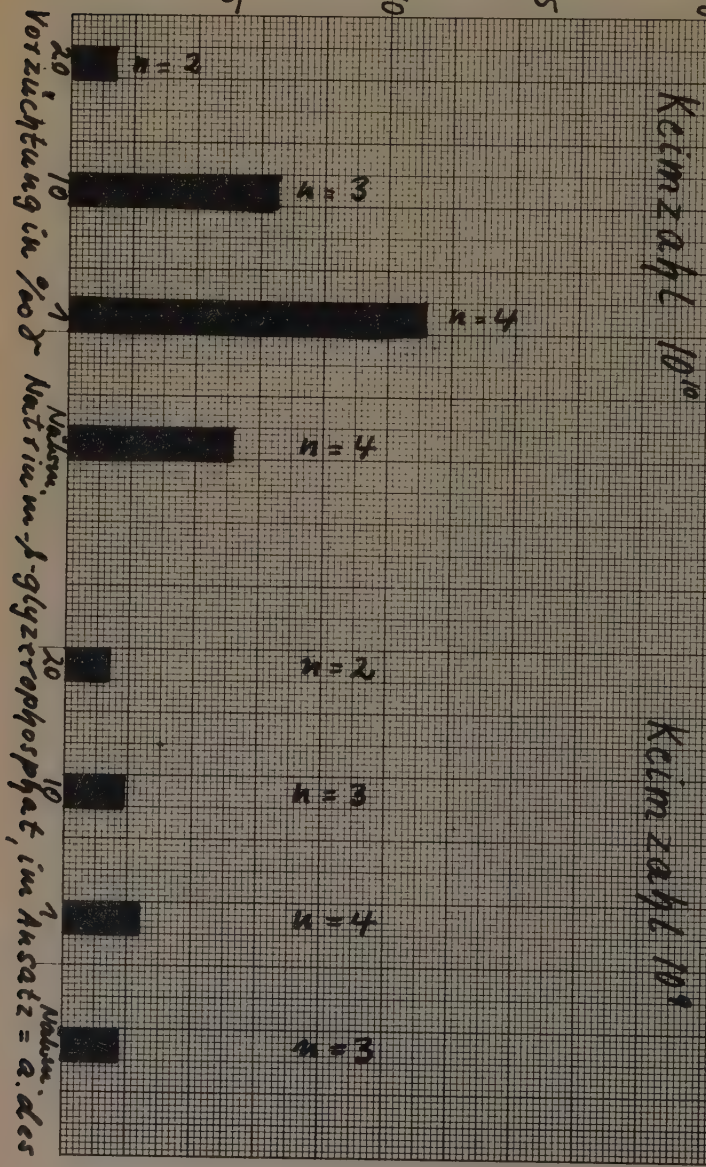


Abb. 4 Mittelwerte aus allen Ansätzen  
III: Natriumglycerophosphat



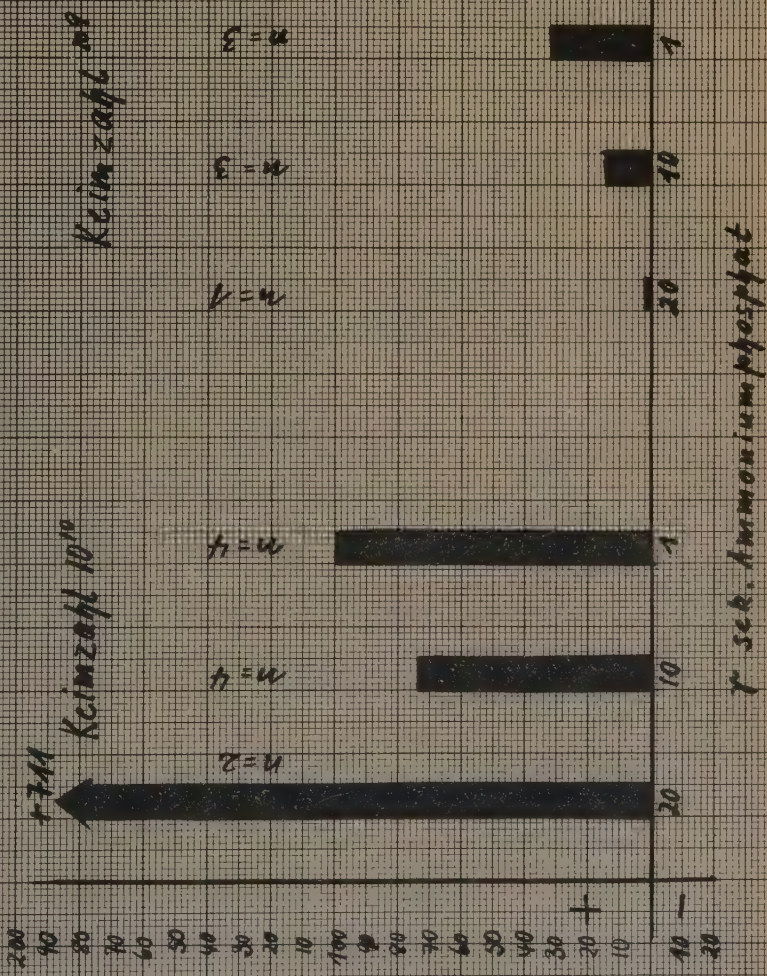
$\gamma$  p-Nitrophenol / Gesamt-Ansatz

Abb. 5 Mittelwerte aus allen Ansätzen  
II. Natrium- $\beta$ -glyzerophosphat

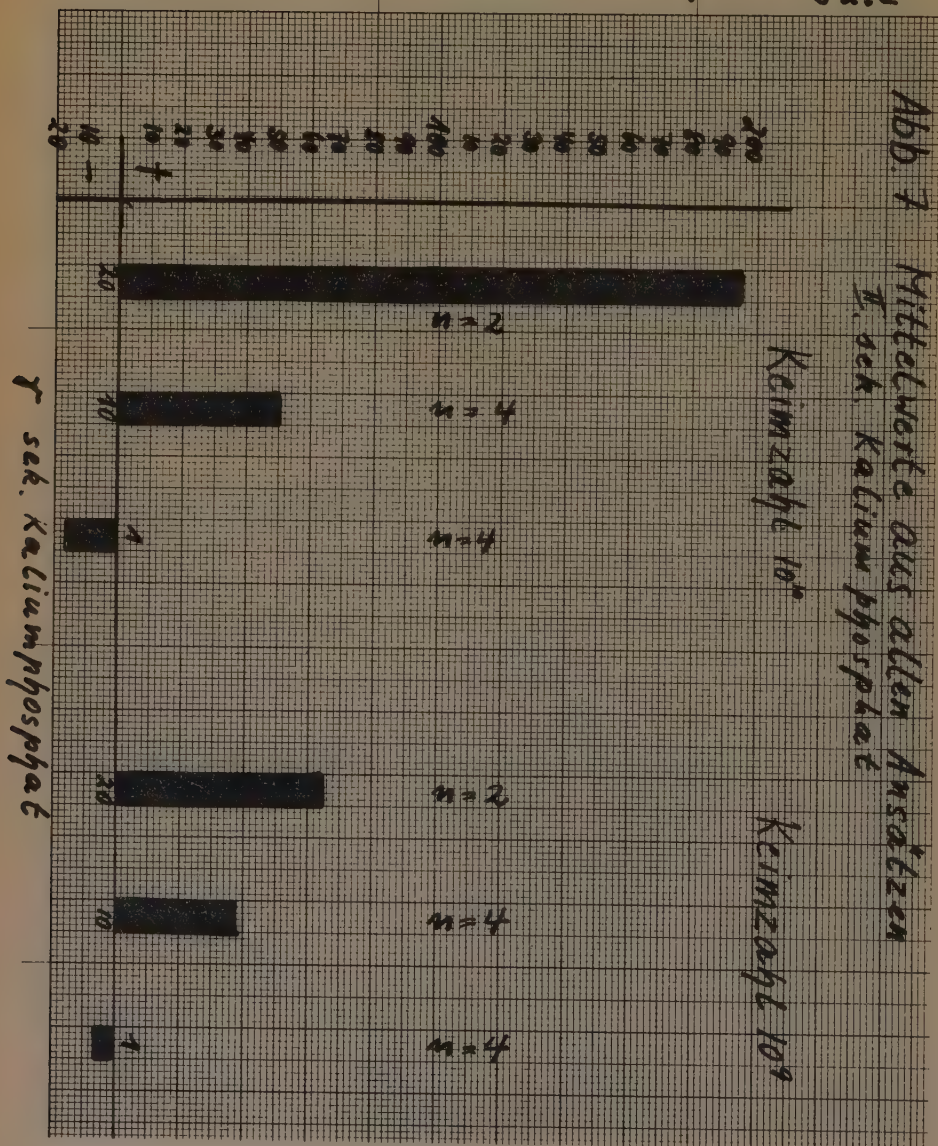


Abweichung von der jeweiligen a. dest. - Kontrolle in  $\pm$  % p-Nitrophenolprogesamt-Ansatz

Abb. 6 Mittelwerte aus allen Ansätzen  
I. sek. Ammoniumphosphat



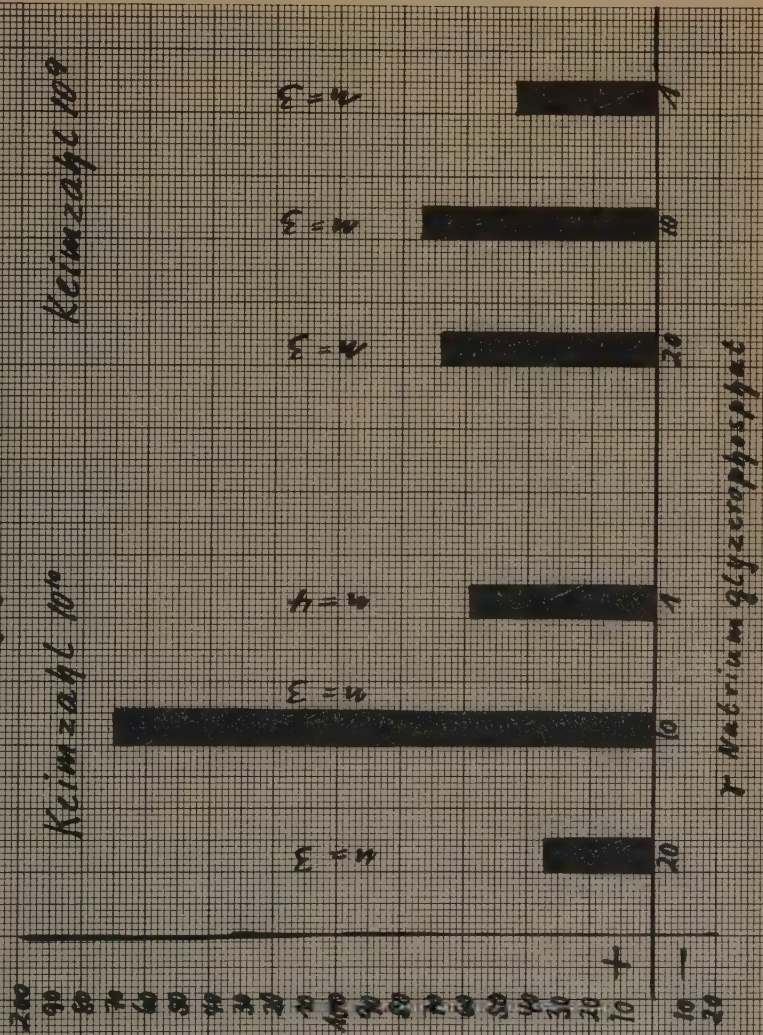
Abweichung von der jeweiligen a. dest.-Kontrolle in  $\pm\%$  p-Nitrophenol pro Gesamt-Ansatz



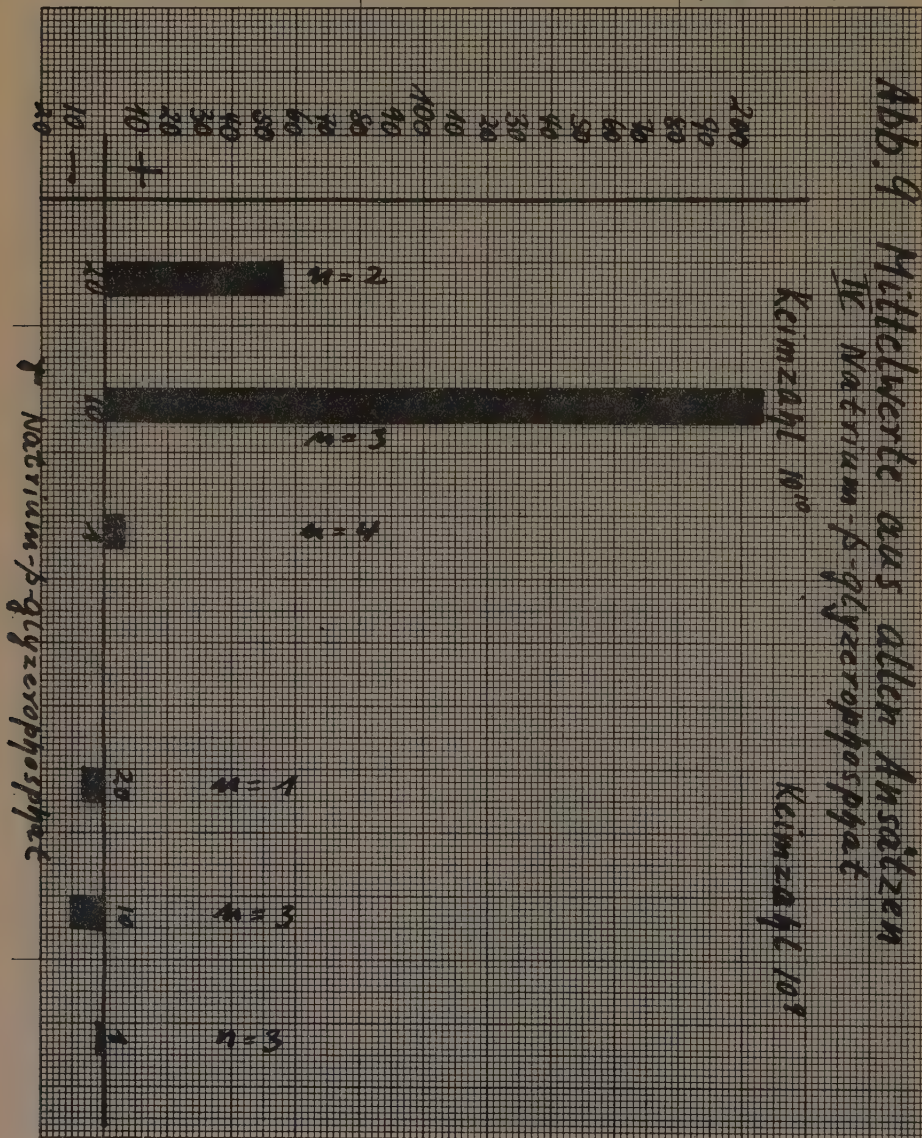
Abweichung von der jeweiligen a. dest.-Kontrolle  
in  $\pm$  % p-Nitrophenol pro Gesamt-Ansatz

Abb. 8 Mittelwerte aus allen Ansätzen

III. Natriumglycerophosphat



Abweichung von der jeweiligen a. dest.-Kontrolle in  $\pm\%$  p-Nitrophenol pro Gesamt-Ansatz



## 6) ZUSAMMENFASSUNG

Untersucht wurde der Einfluß verschiedener Phosphate auf die Aktivität der sauren Phosphatase von *M. pyogenes* var. *aureus*. Sg 511.

Die Versuche ergaben bei Verwendung von Konzentrationen zwischen 1 und 20  $\gamma$ /ml meist einen wenig ausgeprägten Anstieg der Fermentaktivität im niedersten Konzentrationsbereich von 1  $\gamma$ /ml. Die Phosphataseaktivität steigt bei Verwendung von sekundärem Ammoniumphosphat und sekundärem Kaliumphosphat bis zu einer Konzentration von 20  $\gamma$ /ml stark an, während sie bei Verwendung von Natriumglycerophosphat und Natrium- $\beta$ -glycerophosphat nur bis zu einer Konzentration von 10  $\gamma$ /ml ansteigt, um dann wieder abzufallen.

Alle Versuchsserien sind in 4-fachem Ansatz durchgeführt und ergaben in den einzelnen Konzentrationsbereichen gleichsinnige Resultate, die aber im Hinblick auf die Streuung nicht immer statistisch beweisend waren.

## 7) LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Auerbach, C. :  
Induction of changes in genes and chromosomes. Problems in chemical mutagenesis.  
Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 16, 199 (1951)
- 2) Barber, M. :  
Coagulase-positive staphylococci resistant to penicillin.  
J. Path. Bact. 59, 373 (1947)
- 3) - The effect of serial passage in other antibiotics on penicillinase-producing staphylococci.  
J. gen. Microbiol. 8, 104 (1953)
- 4) - and J. E. M. Whitehead:  
Bacteriophage types in penicillin-resistant staphylococcal infection.  
Brit. med. J. 1949 II, 565
- 5) Barnes, E. H. and J. F. Morris:  
J. Bact. 73/1, 100 (1957)
- 6) Bryson, V. and M. Demerec:  
Patterns of resistance to antimicrobial agents.  
Ann. N. Y. Acad. Sci. 53, 283 (1950)
- 7) - and W. Szybalski:  
Microbial selection.  
Science 116, 45 (1952)
- 8) Cavalli-Sforza, L. L. and J. Lederberg:  
Isolation of pre-adaptive mutants in bacteria by sib selection.  
Genetics 41, 367 (1956)
- 9) Crampton, C. F., R. Lipshitz and E. Chargaff:  
Studies on nucleoproteins. II. Fraction of desoxyribonucleic acids through fractional dissociation of their complexes with basic proteins.  
J. biol. Chem. 211, 125 (1954)
- 10) Davidson, J. N., I. Leslie and I. C. White:  
The nucleic-acid content of the cell.  
Lancet 1951 I. No. 1287, 260

- 11) Davis, B. :  
Nofiltrability of the agents of genetic recombination in *E. coli*  
*J. Bact.* 60, 507 (1950)
- 12) Demerec, M. :  
Origin of bacterial resistance to antibiotics.  
*J. Bact.* 56, 63 (1948)
- 13) - Chemical mutagens.  
*Hereditas*, Suppl. 201 (1949)
- 14) - and R. Latarjet:  
Mutations in bacteria induced by radiations.  
*Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* 11, 38 (1946)
- 15) Gillissen, G. :  
Die Beeinflussung der Keimresistenz durch Penicillinase.  
*Arch. Mikrobiol.* 27, 146 (1957)
- 16) - Der Einfluß von Desoxyribonuclease (DNase) auf die Größe des penicillin-(pc)resistenten Anteils einer Population von *M. pyogenes* var. *aureus* Sg 511.  
*Experientia (Basel)* 15, 200 (1959)
- 17) - und I. Gillissen:  
Die Resistenzbildung bei Mikroorganismen.  
*Ergebnisse der Mikrobiologie, Immunitätsforschung u. experimentellen Therapie* (1960)
- 18) - und M. Ruda:  
Die Korrelation zwischen Phosphatasenaktivität und Penicillinresistenz bei *M. pyogenes* var. *aureus*.  
*Zbl. Bakter. I. Abt. Orig.* 171, 281 (1958)
- 19) - und A. Schilling:  
Chemoresistenz und Pathogenität von Staphylokokken.  
*Ärztl. Forsch.* 12, 591 (1959)
- 20) Hirsch, H:  
A comparative study of aconitase, fumarase, and DPN linked isocitric dehydrogenase in normal and respiration-deficient yeast.  
*Biochim. biophys. Acta* 9, 674 (1952)

- 21) Horchkiss, R. D.:  
In: The chemical basis of heredity.  
Baltimore: John Hopkins Press 1957.
- 22) Jensen, J., W. Möller und E. Thofern:  
Über die Entstehung abnormer Bakterienformen.  
Naturwiss. 16, 382 (1954)
- 23) Kirby, W. M. M., and L. A. Rantz:  
Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin-resistant staphylococci.  
Science 99, 452 (1944)
- 24) Klein, M. and L. J. Kimmelman:  
The role of spontaneous variants in the acquisition of streptomycin resistance by the Shigellae.  
J. Bact. 52, 471 (1946)
- 25) Lederberg, J. and E. Lederberg:  
Replica plating and indirect selection of bacterial mutants.  
J. Bact. 63, 399 (1952)
- 26) Leuchtenberger, D., R. Vendrely and C. Vendrely:  
A comparison of the content of deoxyribonucleic acid (DNA) in isolated animal nuclei by cytochemical and chemical methods.  
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 37, 33 (1951)
- 27) Levithal, C.:  
The mechanism of DNA replication and genetic recombination in phage.  
Rend. Ist. lombardo 89, 192 (1955)
- 28) McElroy, W. D.:  
Evidence for the occurrence of intermediates during mutations.  
Science 115, 623 (1952)
- 29) Luria, S. E. and M. Delbrück:  
Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance.  
Genetics 28, 491 (1943)
- 30) Merkel, J. R., and E. Steers:  
Relationship between chloramphenicol reductase activity and chloramphenicol resistance in E. coli.  
J. Bact. 66, 389 (1953)

- 31) Newcombe, H. B.:  
Delayed phenotypic expression of spontaneous mutations in *E. coli*.  
*Genetics* 33, 447 (1948)
- 32) Novick, A., and L. Szilard:  
Antimutagens.  
*Nature (Lond.)* 170, 926 (1952)
- 33) Pontecorvo, G.:  
Self-reproduction and all that.  
*Symp. Soc. exp. Biol.* 12, 1 (1958)
- 34) Rowley, D., P. D. Cooper, P. W. Roberts and E. Lester-Smith:  
The site of action of penicillin I: uptake of penicillin in bacteria.  
*Biochem. J.* 46, 157 (1950)
- 35) Schmidt, L. H., and C. L. Sesler:  
Development of resistance to penicillin by pneumococci.  
*Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* 52, 353 (1943)
- 36) - and H. A. Dettwiler:  
Studies on sulfonamide-resistant organisms: development of sulfapyridine resistance by pneumococci.  
*J. Pharmacol. exp. Ther.* 74, 175 (1942)
- 37) Spink, W. W., W. H. Hall and V. Ferris:  
Clinical significance of staphylococci with natural or acquired resistance to the sulphonamides and to penicillin.  
*J. Amer. med. Ass.* 128, 555 (1945)
- 38) Szybalski W.:  
Multiple chemotherapy and antagonism between antimicrobial agents. VI. Internat. Kongr. für Mikrobiologie in Rom 1953.
- 39) Szybalski, W. and V. Bryson:  
Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents.  
I. Cross resistance of *E. coli* to fifteen antibiotics.  
*J. Bact.* 64, 489 (1952)

- 40) Thomson, R. Y., F. C. Heagy, W. C. Hutchinson and J. N. Davidson  
The desoxyribonucleic acid content of the rat cell nucleus and its use in expressing the results of tissue analysis, with particular reference to the composition of liver tissue.  
Biochem. J. 53, 460 (1953)
- 41) Umbreit, W. W., and N. E. Tonhazy:  
The action of streptomycin III. The action of streptomycin in tissue homogenates.  
J. Bact. 58, 769 (1949)
- 42) Vendrely, R. et C. Vendrely:  
La teneur du noyau cellulaire en acide déoxyribonucléique à travers les organes, les individus et les espèces animales.  
Experientia (Basel) 4, 434 (1948)
- 43) Welsch, M. :  
Quelques aspects de la résistance du staphylocoque à la streptomycine.  
C. R. Soc. Biol. (Paris) 143, 1282 (1949)
- 44) Wyss, O., J. B. Clark, F. Haas and W. S. Stone:  
The role of peroxyde in the biological effects of irradiated broth.  
J. Bact. 56, 51 (1948)
- 45) Zinder, N. D., and J. Lederberg:  
Gentic exchange in Salmonella.  
J. Bact. 64, 679 (1952)

Ich danke Herrn Prof. Dr. Kliewe für die freundliche Überlassung eines Arbeitsplatzes in seinem Institut.

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Gillissen für die Stellung des Themas, die vielen Ratschläge während der Versuche und für die Hilfe bei der schriftlichen Zusammenfassung der Arbeit.



## LEBENS LAUF

Ich, Erika Ursula Triebel, bin mit meinem Zwilling Bruder Klaus zusammen am 27.9.33 in Berlin geboren.

Meine Eltern sind Oberregierungsrat Dr. jur. E. Triebel und seine Ehefrau Luise, geb. Hüsemann.

Ostern 1940 wurde ich in die Volksschule in Bünde/Westf. und im Sommer 1944 in die Sexta des Mädchen-Progymnasiums in Bünde aufgenommen. Da die letztere Schule nur bis zur mittleren Reife führte, ging ich Ostern 1951 zur Königin-Mathilde-Schule Herford über. Während der beiden Primajahre besuchte ich das neusprachliche Gymnasium für Jungen in Bünde und legte am 22. März 1954 die Reifeprüfung ab. Im Sommersemester 1954 begann ich das Medizinstudium an der Philipps-Universität Marburg und blieb dort auch im Winter-Semester 1954/55. Im Sommer-Semester 1955 ging ich an die Albert-Ludwig-Universität Freiburg. Am 29.4.57 bestand ich dort die ärztliche Vorprüfung. Während der folgenden drei klinischen Semester studierte ich an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, im Winter-Semester 1958/59 an der Universität Innsbruck, im Sommer-Semester 1959 und im Winter-Semester 1959/60 wieder an der Universität Mainz. Hier bestand ich am 15.6.60 das medizinische Staatsexamen.

Vom 1.11.60 bis 28.2.61 arbeitete ich als Medizinalpraktikantin an der Universitäts-Frauenklinik Mainz, seit dem 1.3.1961 an der Universitäts-Kinderklinik Mainz.









